Supplemento ordinario alla «Gazzetta Ufficiale» n. 161 del 14 luglio 1986 - Serie generale

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I (70%)

GAZZETTA UFFICIALE
DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA **Roma - Lunedì, 14 luglio 1986** SI PUBBLICA NEL POMERIGGIO DI TUTTI I GIORNI MENO I FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DI GRAZIA E GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA 70 - 00100 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 85081

N. 58

MINISTERO
DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

DECRETO MINISTERIALE 12 marzo 1986.

Approvazione dei «Metodi ufficiali di analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino (aceti) e i sottoprodotti della vinificazione».

SOMMARIO

MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

Analisi degli agri di vino (aceti):

Analisi dei sottoprodotti della vinificazione:

LEGGI E DECRETI

MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

DECRETO MINISTERIALE 12 marzo 1986.

Approvazione dei «metodi ufficiali di analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino, aceti e i sottoprodotti della vinificazione».

IL MINISTRO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

DI CONCERTO CON

I MINISTRI DELLE FINANZE, DELLA SANITÀ E DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

Visti l'art. 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, riguardante la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari e l'art. 108 del regolamento per l'esecuzione dello stesso regio decreto-legge, approvato con regio decreto-legge 1° luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nel regio decreto-legge e nel regolamento suddetti dovranno essere eseguite dai laboratori incaricati con i metodi di analisi prescritti da questo Ministero, di concerto con quelli delle finanze e della sanità;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 12 febbraio 1965, n. 162, contenente le norme per la preparazione delle frodi nella preparazione e nel commercio dei mosti, vini ed aceti;

Vista la legge 2 agosto 1982, n. 527, contenente le norme per la produzione e la commercializzazione degli agri;

Visti i regolamenti CEE n. 337/79 del Consiglio del 5 febbraio 1979 e n. 338/79 del Consiglio del 5 febbraio 1979, pubblicati nella *Gazzetta Ufficiale* delle Comunità europee n. L 54 del 5 marzo 1979, relativi, rispettivamente, all'organizzazione comune nel mercato vitivinicolo e alle disposizioni per i vini di qualità prodotti in regioni determinate;

Visto il regolamento CEE n. 1108/82 della commissione del 21 aprile 1982, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* delle Comunità europee n. L. 133 del 14 maggio 1982, concernente i metodi di analisi comunitari applicabili al settore dei vini;

Ritenuto opportuno porre a disposizione di tutti gli istituti e laboratori pubblici metodi di analisi idonei per verificare taluni parametri non ancora presi in considerazione dalla normativa comunitaria, di cui al citato regolamento CEE n. 1108/82, affinché le analisi da essi compiute risultino uniformi nei procedimenti e nei risultati;

Ritenuto altresì di procedere all'aggiornamento di alcuni metodi ufficiali di analisi approvati con i decreti ministeriali 30 giugno 1958, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 193 dell'11 agosto 1958, 19 giugno 1965, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 168 del 9 luglio 1965, 18 maggio 1971, pubblicato nella *Gazzetta Uffficiale* n. 143 del 7 giugno 1971, 28 agosto 1974, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 30 del 31 gennaio 1975 e 10 febbraio 1976, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 123 dell'11 maggio 1976, nonché di procedere ad una raccolta sistematica dei metodi di analisi non previsti dalla normativa comunitaria;

Sentito il parere della commissione per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agrari e per le sostanze di uso agrario - sottocommissione per i mosti, vini, aceti, sostanze tartariche e tanniche, di cui al decreto ministeriale 11 febbraio 1981, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 204 del 27 luglio 1981;

Decreta:

Art. 1

Sono approvati i «metodi ufficiali di analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino-aceti e per taluni sottoprodotti della vinificazione» descritti nell'allegato al presente decreto.

2 - Libreria - S.O.G.U. n. 161.

Art. 2.

Sono abrogati i decreti ministeriali 30 giugno 1958, 19 giugno 1965, 18 maggio 1971, 28 agosto 1974 e 10 febbraio 1976.

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 12 marzo 1986

Il Ministro dell'agricoltura e delle foreste
PANDOLFI

Il Ministro delle finanze
VISENTINI

Il Ministero della sanità
DEGAN

Il Ministro dell'industria del commercio e dell'artigianato
ALTISSIMO

METODI UFFICIALI DI ANALISI DEI MOSTI E DEI VINI, DEGLI AGRI DI VINO (ACETI) E DEI SOTTOPRODOTTI DELLA VINIFICAZIONE

ANALISI DEI MOSTI E DEI VINI

CONSIDERAZIONI GENERALI

1) *Prelevamento dei campioni.*

Il prelevamento dei campioni deve essere fatto in modo che questi rappresentino fedelmente la massa del prodotto da sottoporre ad analisi.

Nel caso di prodotti in confezioni originali chiuse, quando per il tipo di controllo analitico da effettuare non è consigliabile l'apertura, si preleva a caso dalla partita un numero rappresentativo di confezioni per formare i campioni per l'analisi.

Nel caso di prodotti sfusi la massa da campionare deve essere preventivamente resa omogenea; qualora ciò non sia possibile si prelevano tre aliquote distinte: una verso la sommità del liquido, un'altra nella parte centrale e l'ultima in fondo. Queste, mescolate tra loro, vengono utilizzate per la formazione dei campioni per l'analisi.

Tuttavia in casi particolari può essere utile eseguire il prelevamento prima dell'omogeneizzazione della massa e in zone diverse allo scopo di meglio evidenziare una frode (esempio: vino stratificato sopra una soluzione zuccherina). Successivamente si effettua un ulteriore prelevamento sulla massa resa omogenea. In tale caso il verbale di prelevamento dovrà specificare le modalità seguite per il prelievo di ciascun campione.

Nel caso di prodotti in fermentazione o suscettibili di fermentare è necessario aggiungere ai campioni per le analisi un idoneo quantitativo di un appropriato antifermentativo la cui natura e concentrazione deve essere chiaramente indicata sul verbale di prelevamento. Ad esempio un antifermentativo efficace è il monobromo acetato di etile al 5% in alcol addizionato nella dose di 1 ml per litro.

Qualora si debba ricercare o dosare il saccarosio eventualmente aggiunto, occorre impedirne l'inversione rendendo alcalino (pH 10-11) il prodotto: a tal fine prelevare un secondo campione e portarlo al pH indicato con una soluzione di idrossido di sodio al 40%. Il pH deve essere controllato dopo alcuni minuti (5-10) ed eventualmente ripristinato con aggiunta di altra soda. Aggiungere anche in questo caso l'antifermentativo. Questo campione servirà esclusivamente per la ricerca e la determinazione del saccarosio.

Tutti i campioni per le analisi trattati dovranno portare in etichetta l'indicazione "VELENO" chiara ed evidente, nonché la quantità e la qualità delle sostanze aggiunte.

Nel prelevamento di mosti concentrati sarà bene tener presente che la concentrazione può portare, specie se si è praticata una preventiva disacidificazione, a fenomeni di insolubilizzazione che rendono eterogenea la massa. D'altra parte la elevata densità e viscosità del mosto concentrato ne ostacolano la omogeneizzazione, per cui è bene porre la maggior cura possibile nel prelevare il campione.

Quando il campione si deve riferire al prodotto di più recipienti, si preleva da ognuno un'aliquota proporzionale alla quantità di prodotto contenuto in ciascuno di essi; tali aliquote si mescolano per formare il campione medio dal quale si preleva la quantità necessaria per la formazione dei campioni per l'analisi.

Il laboratorio potrà indicare ulteriori e particolari modalità di prelevamento in vista di specifiche ricerche analitiche. La procedura seguita dovrà essere riportata sul verbale di prelevamento.

I campioni prelevati per le analisi devono essere confezionati in bottiglie di vetro ben pulite, preventivamente avvinate e chiuse con tappi idonei.

Nelle operazioni di prelevamento devono comunque essere osservate le norme di legge vigenti in materia.

2) *Controllo dei campioni prima dell'analisi.*

Prima di procedere all'analisi del prodotto, è necessario controllare accuratamente se il campione è in tutto rispondente a quanto risulta dal verbale di prelievo e, in particolare osservare l'integrità della chiusura dei sigilli, del cartellino e dello spago.

Se nel periodo di tempo trascorso fra il prelievo e l'analisi, si fossero verificate alterazioni del campione, esse dovranno essere riferite nel certificato di analisi, tenendone conto nella formazione del giudizio.

I - ESAME ORGANOLETTICO

1. Scopo e campo di applicazione

Definire i caratteri organolettici del mosto, del vino e dell'aceto al fine della valutazione della qualità del prodotto, della rispondenza alle denominazioni attribuite, dell'accertamento di alterazioni, difetti, malattie, presenza di sostanze estranee.

2. Principio del metodo

Il prodotto viene sottoposto:

a) ad osservazione visiva per accertare l'eventuale sviluppo di gas, la presenza e la persistenza della spuma, la fluidità, lo stato di limpidezza e la consistenza di eventuali depositi, il colore;

b) a degustazione per definire l'odore ed il sapore.

3. Procedimento ed espressione del risultato

Eseguire l'esame organolettico da parte di almeno tre persone secondo le modalità di uno dei metodi noti o riconosciuti da organizzazioni professionali o di uso corrente, da citarsi nel certificato di analisi.

II - ESAME MICROSCOPICO

1. Scopo e campo di applicazione

Accertare la natura delle sostanze solide presenti nel mosto, nel vino o nell'aceto con particolare riguardo alla presenza di depositi conseguenti ad aggiunte, immissioni, trattamenti non consentiti; alla natura ed al numero dei microrganismi presenti.

2. Principio del metodo

Il sedimento naturale od ottenuto per centrifugazione del prodotto, viene esaminato al microscopio ad opportuno ingrandimento secondo le tecniche usuali.

III - SAGGIO DI STABILITÀ

1. Scopo e campo di applicazione

Accertare la stabilità del vino e dell'aceto nei riguardi dell'azione dell'aria, della luce e della temperatura.

2. Principio del metodo

Mantenendo il prodotto in definite condizioni di luce, di temperatura e di contatto con l'ossigeno dell'aria si osserva l'eventuale formazione di intorbidamento o variazione del colore.

3. Procedimento

3.1 *Lasciare il prodotto in un bicchiere al riparo dalla luce, a temperatura tra 5 e 10°C a contatto dell'aria per 24-48 h.*

I vini contenenti ferro in quantità eccessiva danno luogo ad intorbidamenti per precipitazione di fosfato ferrico o fosfato ferrico-calcico ("casse" bianca) o intorbidamenti per precipitazione di tannato ferrico ("casse" bleu).

3.2 *Mantenere il prodotto in recipiente chiuso, ben colmo, alla luce ed a temperatura di 30-35°C per 10 giorni.*

I prodotti contenenti quantità eccessive di rame si intorbidano ("casse" rameosa).

3.3 *Mantenere il prodotto alla luce a contatto dell'aria ed a temperatura ambiente per 24-48 h.*

I prodotti sani non presentano alterazioni di colore o intorbidamenti; quelli affetti da "intorbidamento ossidasico" ("casse" ossidasica) danno, se rossi, imbrunimento e precipitato, se bianchi, imbrunimento.

IV - POTERE ROTATORIO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinare il potere rotatorio per accertare la natura e la concentrazione degli zuccheri presenti nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

Misura dell'angolo di rotazione del piano della luce polarizzata alla lunghezza d'onda di 589 nm ed alla temperatura di 20°C, dovuta al prodotto dealcolizzato e defecato, eventualmente sottoposto ad inversione, contenuto in tubo polarimetrico da 200 mm.

3. Reattivi

3.1 *Scambiatore anionico fortemente basico in forma CO_3^- (Dowex 1 X8 100-200 mesh o equivalente).*

Poiché la resina viene commercializzata in forma Cl^-, per ottenerla in forma CO_3^- si opera nel modo seguente: porre in una colonna cromatografica di adeguate dimensioni la quantità di resina che si desidera preparare. Far percolare una soluzione 2N di carbonato ammonico fino a scomparsa della reazione dei cloruri nell'eluato. Lavare con acqua e conservare la resina umida in frigorifero.

3.2 *Sodio idrossido: soluzione 0,5 N.*
3.3 *Acido acetico: soluzione 0,5 N.*
3.4 *Piombo acetato basico: soluzione d — 1,32.*
3.5 *Sodio fosfato bibasico: soluzione 7,6%.*
3.6 *Acido cloridrico: d — 1,18.*
3.7 *Carbone decolorante.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Polarimetro con graduazione in gradi di cerchio o scala saccarimetrica, di sensibilità tale da permettere il sicuro apprezzamento di deviazioni pari a 0,05 gradi di cerchio.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione* (*)

Diluire 100 g di mosto concentrato a 250 ml con acqua.

A seconda dei casi porre in un bicchiere:

I) 70 ml della diluizione del mosto concentrato o di mosto con meno di 4 gradi di alcol o di vino o mosto con più di 4 gradi di alcol e $d_{20}^{20} \geq 1{,}0400$.

II) Oppure 120 ml di vino a $d_{20}^{20} \leq 1{,}0400$.

Aggiungere 8-10 g dello scambiatore anionico e sottoporre ad agitazione controllando con una cartina-indicatore il raggiungimento della neutralità (eventualmente aggiungere altra resina) e filtrare.

5.1.1 *Defecazione.*

Porre in un matraccio da 100 ml:

a) 50 ml della diluizione del mosto concentrato trattata come in 5.1;

b) 50 ml di mosto con meno di 4 gradi di alcol, trattato come in 5.1.

Aggiungere 5 ml della soluzione di acetato basico di piombo; agitare e dopo 10 min portare a volume con acqua e filtrare. Porre 50 ml di filtrato in un matraccio da 100 ml, aggiungere 5 ml della soluzione di fosfato di sodio, agitare, portare a volume e dopo 15 min filtrare.

5.1.2 *Dealcolizzazione e defecazione.*

Porre in una capsula di porcellana:

c) 50 ml di vino o mosto con più di 4 gradi di alcol e $d_{20}^{20} \geq 1{,}0400$ trattato come in 5.1;

d) oppure 100 ml di vino a $d_{20}^{20} \leq 1{,}0400$ trattato come in 5.1.

Evaporare su bagnomaria bollente sino a ridurre il volume ad un terzo. Travasare quantitativamente in un matraccio da 100 ml. Raffreddare ed aggiungere 5 ml della soluzione di acido acetico e 5 ml (caso c) o 10 ml (caso d) della soluzione di acetato basico di piombo, agitare e dopo 10 min portare a volume e filtrare.

Porre 50 ml di filtrato in un matraccio da 100 ml, aggiungere 5 ml (caso c) oppure 10 ml (caso d) della soluzione di solfato di sodio; agitare, portare a volume e dopo 15 min filtrare.

Per i vini contenenti meno di 10 g/l di zuccheri (caso e) aggiungere a 50 ml del filtrato 0,40 g di fosfato di sodio in cristalli, agitare fino a dissoluzione senza diluire ulteriormente e dopo 15 min filtrare.

5.2 *Inversione del saccarosio.*

Porre 40 ml della soluzione proveniente da 5.1.1 o da 5.1.2 in un matraccio da 50 ml; aggiungere 3 ml di acido cloridrico e mantenere in bagnomaria a 68-70°C per 15 min. Raffreddare, neutralizzare e portare a volume.

5.3 *Misura della deviazione polarimetrica.*

Il liquido ottenuto da 5.1.1 o 5.1.2 o 5.2 da sottoporre alla misura polarimetrica deve essere limpido ed incolore. Se necessario decolorare con idonea quantità di carbone. Eseguire la misura al polarimetro a 20°C, in tubo da 200 mm.

6. Espressione del risultato

6.1 *Potere rotatorio.*

Il potere rotatorio si esprime in gradi di cerchio con il segno + o − a seconda che il piano della luce polarizzata sia deviato a destra o a sinistra.

I fattori di conversione delle scale saccarimetriche in gradi di cerchio sono:

1) scala saccarimetrica Wentzke 1° = 0,34567 gradi di cerchio
2) scala saccarimetrica Internazionale 1° = 0,34620 gradi di cerchio
3) scala saccarimetrica Francese 1° = 0,21667 gradi di cerchio.

Il potere rotatorio (P) del prodotto si calcola con le formule seguenti:

caso a) $P = 10\ D\ M$

dove D è la deviazione polarimetrica, M la massa volumica del mosto concentrato;

caso b) e c) $P = 4\ D$
caso d) $P = 2\ D$
caso e) $P = D$

Il potere rotatorio (P_i) del prodotto dopo inversione si calcola con le formule seguenti:

caso a) $P_i = 12{,}5\ D\ M$
caso b) e c) $P_i = 5\ D$
caso d) $P_i = 2{,}5\ D$
caso e) $P_i = 1{,}25\ D$

(*) Questo metodo di preparazione del campione, in luogo della percolazione del vino in colonna di scambiatore come indicato al capitolo "Zuccheri riduttori", è raccomandato quando si voglia ridurre al minimo il numero delle diluizioni (vedi medoti CEE).

6.2 *Glucosio e fruttosio.*

Si esprime in g/l di glucosio (G) e di fruttosio (F) calcolati con le formule:

$$G = 0{,}638\ Z + 3{,}429\ P$$
$$F = 0{,}362\ Z - 3{,}429\ P$$
$$G = Z - F$$

In presenza di saccarosio:

$$G = 0{,}638\ Z_i - 3{,}002\ P + 6{,}431\ P_i$$
$$F = 0{,}362\ Z_i - 3{,}002\ P - 0{,}427\ P_i$$

dove Z sono i g/l di zuccheri riduttori e Z_i sono i g/l di zuccheri riduttori totali dopo inversione, determinati sulla stessa soluzione sottoposta all'esame polarimetrico.

6.3 *Saccarosio.*

Si esprime in g/l di saccarosio (S) calcolato con la formula

$$S = 5{,}704 - (P - P_i)$$

7. Osservazioni

I fattori che compaiono nelle formule sono stati calcolati in base ai seguenti valori del potere rotatorio specifico dei singoli zuccheri:

Glucosio	$[\alpha]_D^{20} = +52{,}8$
Fruttosio	$[\alpha]_D^{20} = -93$
Saccarosio	$[\alpha]_D^{20} = +66{,}5$

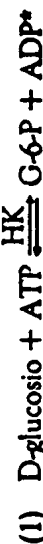
V - GLUCOSIO

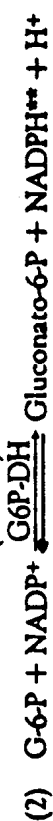
1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del glucosio nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

In presenza di adenosintrifosfato (ATP), il glucosio viene fosforilato in glucosio-6-fosfato (G-6-P), usando come catalizzatore esochinasi (HK).

(1) $\text{D-glucosio} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{HK}} \text{G-6-P} + \text{ADP}^{*}$

Il G-6-P viene trasformato in gluconato-6-fosfato per azione dell'enzima glucosio-6-fosfatodeidrogenasi (G6P-DH) in presenza di nicotinamide-adenin dinucleotide fosforilato (NADP).

(2) $\text{G-6-P} + \text{NADP}^{+} \xrightleftharpoons{\text{G6P-DH}} \text{Gluconato-6-P} + \text{NADPH}^{**} + \text{H}^{+}$

La quantità di NADPH formatosi viene misurata dalla variazione della DO ed equivale al contenuto di glucosio presente (DO = densità ottica).

3. Reattivi(***)

3.1 *Acido perclorico: soluzione circa 0,33 M.*

Diluire 2,85 ml di acido perclorico al 70% a 100 ml con acqua bidistillata.

3.2 *Potassio idrossido: soluzione 2 N circa.*

3.3 *Trietanolamina cloridrato.*

3.4 *Magnesio solfato.*

3.5 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*

3.6 *Nicotinamide-adenin dinucleotide fosforilato, sale bisodico ($NADP\text{-}Na_2H$).*

3.7 *Adenosin-5'-trifosfato, sale bisodico ($ATP\ Na_2H_2 \cdot 3H_2O$).*

3.8 *Esochinasi (HK) da lievito: sospensione cristallina in soluzione di solfato di ammonio 3,2 M; 140 U/mg (25°C).*

3.9 *Glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6P-DH) da lievito: sospensione in soluzione di solfato di ammonio 3,2 M; 140 U/mg (25°C).*

(*) - ADP = adenosindifosfato.

(**) - NADPH = nicotinamide-adenin dinucleotide fosforilato, forma ridotta.

(***) - Possono essere usati i reattivi disponibili in commercio in confezioni pronte per l'uso.

3.10 *Acqua bidistillata di recente da usare per tutte le soluzioni.*

3.11 *Soluzione tampone a pH = 7,5.*

Sciogliere in un matraccio da 100 ml 5,6 g di cloridrato di trietanolamina e 0,740 g di solfato di magnesio in 50 ml di acqua, portare a pH = 7,5 con circa 6 ml di idrossido di sodio ed a volume con acqua.

La soluzione è stabile a + 4°C.

3.12 *Nicotinamide-adenin dinucleotide fosforilato [NADP (12 mM)].*

Sciogliere 50 mg di NADP-Na_2H in 5 ml di soluzione tampone.
La soluzione è stabile per quattro settimane a + 4°C.

3.13 *Adenosin-5'-trifosfato [ATP (15 mM)].*

Sciogliere 45,5 mg di ATP-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ in 5 ml di soluzione tampone.
La soluzione è stabile per quattro settimane a + 4°C.

3.14 *Esochinasi (HK) (1 mg/ml)/glucosio-6-fosfato deidrogenasi, G6P-DH (0,5 mg/ml).*

Unire 0,25 ml di HK (2 mg/ml) e 0,25 ml di G6P-DH (1 mg/ml).
La sospensione è stabile per un anno a + 4°C.

4. Apparecchiatura

4.1 *Fotometro con filtro a 340 o 366 nm o spettrofotometro per misure cinetiche.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

In tubo da centrifuga pipettare 9 ml di acido perclorico 0,33 M e 1 ml del campione in esame e centrifugare. Portare il pH del campione deproteinizzato e diluito intorno a 7 con idrossido di potassio. La soluzione finale (limpida) dell'esemplare deve contenere al massimo 0,01% di glucosio.

5.2 *Dosaggio del glucosio.*

Eseguire la determinazione in vaschette con percorso ottico di 1 cm alla temperatura di 20-25°C, leggere a 340 oppure a 366 nm contro aria. Pipettare nella vaschetta nell'ordine:

1,00 ml del campione trattato
1,80 ml della soluzione tampone
0,10 ml della soluzione di NADP
0,10 ml della soluzione di ATP.

Agitare con una spatolina e subito eseguire la lettura della DO (E_1). Aggiungere 0,02 ml della sospensione di HK/G6P-DH, agitare nuovamente e leggere le DO ad intervalli di 1 min, calcolando il tempo dall'ultima aggiunta (circa 10 min).

Ricavare E_2 per estrapolazione.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di glucosio per litro, calcolati con la formula:

$$\frac{\Delta E \cdot 3{,}02 \cdot PM}{\varepsilon \cdot l \cdot v \cdot 1000} \cdot F$$

dove:
ΔE = $E_2 - E_1$
3,02 = volume totale della prova in millilitri
PM = peso molecolare del glucosio (180,16)
ε = coefficiente di estinzione specifica di NADH: a 340 nm è uguale a 6,22 $cm^2/\mu mole$; a 366 nm a 3,3 $cm^2/\mu mole$
l = percorso ottico della vaschetta in centimetri
v = volume in millilitri della soluzione del campione introdotto nella vaschetta
F = fattore di diluizione.

7. Osservazioni

Ambedue le lunghezze d'onda indicate sono utilizzabili: la scelta sarà in relazione al tipo di apparecchio usato per la lettura delle DO.

La sensibilità è di circa 10 milligrammi di glucosio per litro.

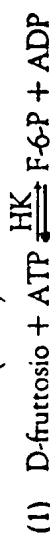
VI - FRUTTOSIO

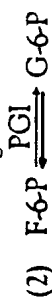
1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del fruttosio nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

In presenza di adenosintrifosfato (ATP) il fruttosio viene fosforilato in fruttosio-6-fosfato (F-6-P) usando come catalizzatore esochinasi (HK).

(1) D-fruttosio + ATP $\overset{HK}{\rightleftharpoons}$ F-6-P + ADP

L'F-6-P viene trasformato in glucosio-6-fosfato (G-6-P) per azione dell'enzima fosfoglucosoisomerasi (PGI).

(2) F-6-P $\overset{PGI}{\rightleftharpoons}$ G-6-P

Il G-6-P formatosi reagisce secondo la formula (2) del metodo "Glucosio".

L'NADPH formatosi viene determinato come per il glucosio ed è proporzionale alla quantità di fruttosio presente.

3. Reattivi (*)

Da 3.1 a 3.14 (*vedi Glucosio*).

3.15 *Ammonio solfato: soluzione 3,2 M.*

3.16 *Fosfoglucosoisomerasi (PGI): da lievito, sospensione cristallina in soluzione di solfato di ammonio 2,8 M; 350 U/mg (25°C).*

3.17 *Fosfoglucosoisomerasi, (PGI) (2 mg di proteina/ml).*

Per diluire la sospensione, se necessario, usare una soluzione di solfato di ammonio 3,2 M.

La soluzione è stabile per un anno a circa + 4°C.

4. Apparecchiatura

Vedi Glucosio, 4.

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

Vedi Glucosio, 5.1.

5.2 *Dosaggio del fruttosio.*

Eseguire la determinazione in vaschette del percorso ottico di 1 cm alla temperatura di 20-25°C, leggere a 340 nm oppure a 366 nm contro aria. Leggere E_1 ed E_2 come in Glucosio 5.2. Aggiungere nella stessa vaschetta 0,01 ml della sospensione di PGI, agitare ed attendere il completamento della reazione (circa 10 min), quindi leggere la DO (E_3).

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di fruttosio per litro, calcolati con la formula:

$$\frac{\Delta E \cdot 3{,}03 \cdot PM}{\varepsilon \cdot l \cdot v \cdot 1000} \cdot F$$

dove:

ΔE = $E_3 - E_2$

3,03 = volume totale della prova in millilitri

PM = peso molecolare del fruttosio (180,16)

ε = coefficiente di estinzione specifica di NADH: a 340 nm è uguale a 6,22 $cm^2/\mu mole$; a 366 nm a 3,3 $cm^2/\mu mole$

l = percorso ottico della vaschetta in centimetri

v = volume in millilitri della soluzione del campione introdotto nella vaschetta

F = fattore di diluizione.

7. Osservazioni

Ambedue le lunghezze d'onda indicate sono utilizzabili: la scelta sarà in relazione al tipo di apparecchio usato per la lettura delle DO.

La sensibilità è di circa 10 milligrammi di fruttosio per litro.

(*) Possono essere usati i reattivi disponibili in commercio in confezioni pronte per l'uso.

VII - PENTOSI E PENTOSANI

1. Scopo e campo di applicazione

Dosaggio dei pentosi e pentosani nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

Trasformazione, per azione dell'acido cloridrico bollente, dei pentosi e pentosani in furfurolo che viene separato per distillazione e dosato per via ponderale dopo precipitazione con acido barbiturico.

3. Reattivi

3.1 *Acido cloridrico (d = 1,06).*
3.2 *Acido barbiturico: soluzione al 5% in acido cloridrico (3.1).*

3.3 *Anilina acetato.*

Ad un volume di anilina distillata di fresco aggiungere un volume di acqua e quindi acido acetico glaciale fino ad ottenere una miscela omogenea.

4. Apparecchiatura

4.1 *Bagno a olio.*
4.2 *Pallone di distillazione munito di imbuto a rubinetto.*
4.3 *Crogioli di vetro con setto poroso (G 3).*

5. Procedimento

5.1 *Separazione e precipitazione del furfurolo.*

Concentrare sotto vuoto da 100 a 300 ml di prodotto, a seconda del probabile contenuto in pentosi e pentosani, fino a circa 25-30 ml e trasferire questo residuo con 100 ml di acido cloridrico (d = 1.06) nel pallone da distillazione. Immergere il pallone in un bagno a olio mantenuto alla temperatura di 160°C e distillare.. Raccogliere e riunire in un bicchiere da 500 ml frazioni di 30 ml di distillato reintegrando il volume di volta in volta con altrettanti ml di acido cloridrico attraverso l'imbusto con rubinetto. Proseguire la distillazione fino a raccogliere almeno 300 ml di distillato, interrompendo comunque la distillazione quando il distillato non colora più una striscia di carta da filtro da filtro imbevuta di acetato di anilina.

Aggiungere al distillato 50 ml della soluzione cloridica di acido barbiturico, agitare e lasciare in riposo una notte.

5.2 *Dosaggio del furfurolo.*

Raccogliere, sul crogiolo a setto poroso previamente pesato, il precipitato giallo e lavarlo con 100 ml di acqua; indi seccare in stufa a 110-120°C fino a peso costante.

6. Espressione del risultato

Si esprime in g/l calcolati con la formula:

$$P \cdot \frac{1000}{V} \cdot 1,062$$

dove:
P = peso del precipitato
V = volume di prodotto prelevato per l'analisi.

7. Osservazioni

Se il prodotto contiene più di 10 g/l di zuccheri, è necessario scacciare l'alcol e fare fermentare dopo aggiunta di 0,5 mg/l di vitamina B_1 e sospensione acquosa di lieviti.

VIII - MANNITOLO E SORBITOLO

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerca del mannitolo e sorbitolo nel vino.

2. Principio del metodo

Il mannitolo ed il sorbitolo vengono separati per cromatografia su carta con due solventi diversi.

3. Reattivi

3.1 *Carbone attivo decolorante.*
3.2 *Sorbitolo: soluzione allo 0,4%.*
3.3 *Mannitolo: soluzione allo 0,4%.*

3.4 *Liquidi di sviluppo:*
I: acetato d'etile, etanolo a 95°, acqua, acido acetico glaciale (65:20:15:1).
II: n-butanolo, piridina, acqua (43:42:15).

3.5 *Argento nitrato (soluzione acetonica).*

A 100 ml di acetone aggiungere 0,5 ml di soluzione acquosa satura di nitrato d'argento (da conservare al buio).

3.6 *Sodio idrossido (soluzione alcolica).*

A 100 ml di etanolo a 95° aggiungere 5 ml di soluzione acquosa satura di idrossido di sodio.

3.7 *Ammonio molibdato: soluzione satura (da conservare al fresco).*

3.8 *Ammonio molibdato (sospensione acetonica).*

Al momento dell'uso aggiungere 2 ml di soluzione satura di molibdato d'ammonio a 40 ml di acetone, agitando continuamente.

3.9 *Sodio tiosolfato: soluzione al 10%.*

4. Apparecchiatura

4.1 *N. 2 vasche cilindriche per cromatografia (altezza cm 37; diametro cm 25).*
4.2 *Carta per cromatografia Wathman n. 1 o equivalente.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

Su un bagnomaria bollente porre 50 ml di vino addizionato con 2 g di carbone e lasciarveli per circa 15 min. (*). Filtrare e portare il liquido incolore e limpido al volume di 50 ml con acqua, Evaporare a secco in capsula di porcellana 10 ml del filtrato, evitando la caramellizzazione. Riprendere il residuo con 2 ml di acqua.

5.2 *Preparazione del cromatogramma.*

Su un foglio di carta da cromatografia di cm 28x35 tracciare a matita delle linee parallele nel senso della lunghezza, alla distanza di 3 cm l'una dall'altra. Il foglio viene così diviso in 9 bande. Le soluzioni vengono deposte a 1,5 cm dal bordo inferiore del foglio e il diametro delle macchie non deve superare i 3 mm. Deporre sulla prima banda 5 microlitri della soluzione di sorbitolo (3.2), e sull'ultima altri 5 microlitri della soluzione di mannitolo (3.3); su quella centrale 2,5 microlitri di ognuna delle due soluzioni e sulle altre bande 5 microlitri dei vini da esaminare, decolorati e concentrati.

5.3 *Sviluppo del cromatogramma e rivelazione delle macchie.*

Arrotolare il foglio a forma di cilindro mantenendo i due bordi ravvicinati con una graffetta, ma senza che si tocchino e porlo in una camera cromatografica contenente il liquido di sviluppo (I) e già satura di vapori. Lasciar migrare fino a circa 2 cm dal bordo superiore. Togliere il foglio, lasciarlo asciugare all'aria, tagliare le due bande laterali ed immergerle nella soluzione acetonica di nitrato d'argento. Lasciarle asciugare ed immergerle nella soluzione alcolica di idrossido di sodio: compaiono rapidamente alla stessa altezza le macchie corrispondenti al mannitolo ed al sorbitolo.

Tagliare le due bande ad 1 cm al di sotto delle macchie e, usando le bande stesse come riferimento, tagliare il resto del foglio allo stesso livello e spruzza-

(*) Può essere utile completare questo trattamento con una deionizzazione del filtrato su due colonne di resine, l'una anionica e l'altra cationica forte, in fase OH^- e H^+.

re la parte superiore (C) con la soluzione acetonica di molibdato ammonico. Lsciar asciugare e dopo aver nuovamente arrotolato il foglio, introdurlo in un'altra camera cromatografica contenente il II liquido di sviluppo. Lasciar migrare il solvente, asciugare all'aria e rivelare le macchie come già indicato per le due striscie laterali.

La macchia corrispondente al sorbitolo sarà quella inferiore. Nell'ordine degli Rf crescenti, le macchie successive corrispondono a: mannitolo, arabitolo, glucosio, fruttosio, eritrolo, glicerolo.

IX - SORBITOLO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del sorbitolo nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

In presenza di nicotinamide-adenin dinucleotide (NAD), il D-sorbitolo viene ossidato a fruttosio per azione catalitica della sorbitol-deidrogenasi (SDH) e NAD viene ridotto a NADH. NADH formatosi deve essere riossidato a NAD, ciò che avviene in presenza di acetaldeide e alcoldeidrogenasi (ADH).

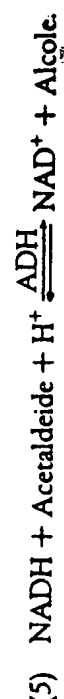
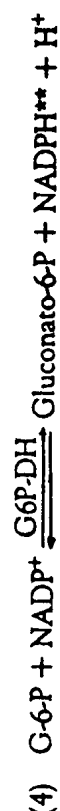
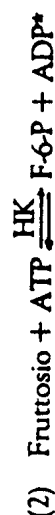
Il fruttosio, derivato dal sorbitolo, è trasformato in gluconato-6-fosfato con adenosin-5'-trifosfato (ATP) e nicotinamide-adenin dinucleotide fosforilato (NADP) e con gli enzimi esochinasi (HK), glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6P-DH) e fosfoglucosoisomerasi (PGI).

(1) $\text{D-sorbitolo} + NAD^+ \xrightarrow{SDH} \text{Fruttosio} + NADH + H^+$

(2) $\text{Fruttosio} + ATP \xrightleftharpoons{HK} \text{F-6-P} + ADP^*$

(3) $\text{F-6-P} \xrightleftharpoons{PGI} \text{G-6-P}$

(4) $\text{G-6-P} + NADP^+ \xrightleftharpoons{G6P\text{-}DH} \text{Gluconato-6-P} + NADPH^{**} + H^+$

(5) $NADH + \text{Acetaldeide} + H^+ \xrightleftharpoons{ADH} NAD^+ + \text{Alcole}$

La quantità di NADPH formatosi viene misurata dall'incremento della DO ed equivale al contenuto di sorbitolo presente.

3. Reattivi

3.1 *Acido perclorico: soluzione circa 1 N.*

Diluire 8,55 ml di acido perclorico al 70% a 100 ml con acqua.

(*) - ADP — adenosindifosfato.
(**) - NADPH — nicotinamide-adenin dinucleotide fosforilato, forma ridotta.

3.2 *Potassio idrossido: soluzione 2 N.*

3.3 *Trietanolamina cloridrato.*

3.4 *Magnesio solfato.*

3.5 *ß-nicotinamide-adenin dinucleotide, ß-NAD.*

3.6 *Nicotinamide-adenin dinucleotide fosforilato, sale bisodico, NADP-Na_2H.*

3.7 *Adenosin-5'-trifosfato, sale bisodico, ATP-$Na_2H_2.3H_2O$.*

3.8 *Aldeide acetica: soluzione circa 0,18 M.*

3.9 *Esochinasi, HK: da lievito, sospensione cristallina a 2 mg/ml in solfato di ammonio 3,2 M; 140 U/mg (25°C).*

3.10 *Glucosio-6-fosfato deidrogenasi, G6P-DH: da lievito, sospensione cristallina a 1 mg/ml in solfato di ammonio 3,2 M; 140 U/mg (25°C).*

3.11 *Fosfoglucosioisomerasi, PGI: da lievito, sospensione cristallina a 2 mg/ml in solfato di ammonio 3,2 M; 350 U/mg (25°C).*

3.12 *Alcol deidrogenasi, ADH: da lievito, sospensione cristallina a 30 mg/ml in solfato di ammonio 3,2 M; 200 U/mg (25°C).*

3.13 *Sorbitol deidrogenasi, SDH: da fegato di pecora, liofilizzata, 1 mg di proteina/6 mg di liofilizzato; 25 U/mg (25°C).*

3.14 *Acqua ridistillata di recente da usare per tutte le soluzioni.*

3.15 *Soluzione tampone a pH = 8,0:*

Sciogliere in un matraccio da 100 ml 5,6 g di cloridrato di trietanolamina e 0,1 g di solfato di magnesio in 80 ml di acqua; portare a pH = 8,0 con idrossido di potassio e a volume con acqua.

La soluzione è stabile a +4°C.

3.16 *Nicotinamide-adenin dinucleotide/nicotinamide-adenin dinucleotide fosforilato (30 mM di ß-NAD; circa 13 mM di NADP):*

Sciogliere 100 mg di ß-NAD e 50 mg di NADP-Na_2H in 5 ml di acqua.

La soluzione è stabile per circa quattro settimane a +4°C.

3.17 *Adenosin-5'-trifosfato, ATP (circa 83 mM):*

Sciogliere 250 mg di ATP-$Na_2H_2.3H_2O$ e 250 mg di bicarbonato di sodio in 5 ml di acqua.

La soluzione è stabile per circa quattro settimane a +4°C.

3.18 *Acetaldeide (circa 0,18 M):*

Diluire 1 ml di acetaldeide (distillata di fresco) a 100 ml con acqua.

La soluzione è stabile per un giorno.

3.19 *Esochinasi, HK (0,4 mg/ml)/Glucosio-6-fosfato deidrogenasi, G6P-DH (0,4 mg/ml)/fosfoglucosioisomerasi, PGI (0,8 mg/ml):*

Miscelare 0,2 ml di HK, 0,4 ml di G6P-DH e 0,4 ml di PGI.

Le singole sospensioni devono essere accuratamente agitate prima del prelievo.

La miscela è stabile per un anno a +4°C.

3.20 *Alcol deidrogenasi, ADH:*

Diluire 0,01 ml di ADH con 1 ml della soluzione di solfato di ammonio.

La sospensione è stabile per un giorno a +4°C.

3.21 *Sorbitol deidrogenasi, SDH (5 mg/ml):*

Sciogliere 30 mg di liofilizzato in 1,0 ml di acqua.

La soluzione è stabile per due settimane a +4°C.

4. Apparecchiatura

4.1 *Fotometro con filtro a 340 e 366 nm o spettrofotometro per misure cinetiche muniti di porta-vaschette termostatato.*

4.2 *Pipette per test enzimatici da 0,05, 0,1, 1 e 2 ml.*

4.3 *Cronometro.*

4.4 *Spatoline di plastica o di vetro con estremità ricurva.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

Concentrare 25 ml di vino a circa un terzo del volume iniziale per eliminare l'alcole. Portare il residuo a temperatura ambiente e, quindi, a 25 ml con acqua ridistillata.

Per deproteinizzare a 10 ml del liquido limpido aggiungere 10 ml di acido perclorico 1 N (precedentemente raffreddato in frigorifero o bagno di ghiaccio); aggiungere 5 ml della soluzione di idrossido di potassio (non è necessario neutralizzare esattamente, perché la soluzione 3.18 ha sufficiente capacità-tampone).

Conservare la soluzione in bagno di ghiaccio per circa 20 min; eliminare il precipitato di perclorato di potassio per filtrazione.

Il filtrato è stabile, a +4°C, per 24 h.

5.2 *Dosaggio del sorbitolo.*

Eseguire la determinazione in vaschette del percorso ottico di 1 cm alla temperatura di 20-25°C, leggere a 340 oppure a 366 nm contro aria.

3 - Libreria - *S.O.G.U.* n. 161.

Eseguire in parallelo una prova in bianco sostituendo al campione in esame 0,5 ml di acqua ridistillata (una prova è sufficiente per ciascuna serie di determinazioni).

Pipettare nelle vaschette nell'ordine:

2,00 ml della soluzione tampone
0,10 ml della soluzione di NAD/NADP
0,10 ml della soluzione di ATP
0,20 ml della soluzione di acetaldeide
0,50 ml del campione trattato
0,05 ml della sospensione di HK/G6P-DH/PGI
0,02 ml della sospensione di ADH.

Agitare con la spatolina e dopo 20 min, eseguire la lettura della DO (E_1). Aggiungere 0,05 ml della soluzione di SDH ponendo la goccia sull'estremità ricurva della spatolina; agitare nuovamente ed eseguire la lettura della DO ad intervalli di 5 min, calcolando il tempo dell'aggiunta della soluzione SDH (circa 30 min); se la reazione continua, proseguire le letture fino ad incrementi costanti.

Ricavare E_2 per estrapolazione.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di sorbitolo per litro calcolati con una delle due formule:

a 340 nm: $\Delta E \cdot 0,443$ = g sorbitolo/l
a 366 nm: $\Delta E \cdot 0,833$ = g sorbitolo/l

dove:

$\Delta E = (E_2 - E_1)_{campione} - (E_2 - E_1)_{prova\ in\ bianco}$

7. Osservazioni

Ambedue le lunghezze d'onda indicate sono utilizzabili: la scelta sarà in relazione al tipo di apparecchio usato per la lettura delle DO.

La soluzione da sottoporre alla lettura spettrofotometrica non deve contenere più di 0,2 grammi di sorbitolo per litro a 340 nm e non più di 0,1 a 366 nm.

Nel caso dei vini rossi l'azzeramento deve essere eseguito non contro aria, ma in confronto con una prova in bianco costituita da 2,5 millilitri di tampone e 0,5 millilitri del filtrato del campione.

In presenza di glucosio e fruttosio (mosto, vino dolce) aggiungere circa 2 grammi di lievito di birra fresco e lasciare fermentare in termostato a 25°C; eliminare il lievito per centrifugazione. Quindi procedere come in 5.1 (Preparazione del campione).

Qualora si adottassero condizioni diverse da quelle indicate nel metodo, applicare la formula seguente:

$$\frac{\Delta E \cdot 3,02}{\varepsilon \cdot l \cdot v} = \mu\text{mole di sorbitolo contenute in 1 ml della soluzione del campione}$$

dove:

ΔE = $(E_2 - E_1)_{campione} - (E_2 - E_1)_{prova\ in\ bianco}$
3,02 = volume totale della prova in millilitri
ε = coefficiente di estinzione specifica di NADH: a 340 nm è uguale a 6,22 $cm^2/\mu mole$; a 366 nm a 3,3 $cm^2/\mu mole$
l = percorso ottico della vaschetta in centimetri
v = volume in millilitri della soluzione del campione introdotto nella vaschetta.

Tenendo conto del peso molecolare del sorbitolo (182,17) e delle diluizioni effettuate si risale ai grammi di sorbitolo per litro.

X - GLICEROLO e 2,3-BUTANDIOLO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del glicerolo e del 2,3 butandiolo nei vini.

2. Principio del metodo

Il glicerolo ed il 2,3-butandiolo, separati dalle sostanze interferenti per trattamento con scambiatori ionici, vengono ossidati con acido periodico rispettivamente ad aldeide formica e ad aldeide acetica che sono poi dosate colorimetricamente.

3. Reattivi

3.1 *Scambiatore cationico fortemente acido.*

Amberlite IR-120 (H^+) o eqivalente.

3.2 *Scambiatore anionico fortemente basico.*

Amberlite IR A-400 (OH^-) o equivalente.

3.3 *Acido cloridrico 1:1 (v/v).*

3.4 *Piombo acetato neutro* $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$.

3.5 *Sodio fosfato bibasico* $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$.

3.6 *Sodio periodato: soluzione 0,05 M.*

In un matraccio da 1 litro sciogliere in acqua 11,338 g di periodato di sodio, aggiungere 50 ml di acido solforico 1 N e completare il volume con acqua.

3.7 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*

3.8 *Floroglucina: soluzione allo 0,2%.*

3.9 *Sodio acetato: soluzione al 27%.*

3.10 *Sodio periodato: soluzione 0,1 M.*

In un matraccio da 1 litro sciogliere in acqua 22,676 g di periodato di sodio, aggiungere 100 ml di acido solforico 1 N e completare il volume con acqua.

3.11 *Sodio nitroprussiato: soluzione al 2%, preparata di recente.*

3.12 *Piperidina: soluzione al 10%.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Due colonnine in vetro collegabili fra loro, una contenente 15 ml ca. di scambiatore cationico (dimensioni interne mm 210x7), l'altra contenente 40 ml ca. di scambiatore anionico (mm 190x16).*

4.2 *Apparecchio da distillazione munito di colonna di Vigreux di 40 centimetri.*

4.3 *Spettrofotometro adatto a letture cinetiche.*

5. Procedimento

5.1 *Separazione del glicerolo e del 2,3-butandiolo.*

Nel pallone dell'apparecchio da distillazione introdurre 50 ml di vino e 5 ml dell'acido cloridrico; sovrapporre al pallone la colonna di Vigreux collegata ad un refrigerante e distillare lentamente 10 ml.

Dopo raffreddamento travasare quantitativamente il residuo della distillazione in un matraccio da 100 ml e portare a volume con acqua. Fare percolare 5 ml della soluzione limpida (filtrare se necessario), attraverso la colonna di scambiatore cationico, collegata direttamente a quella di scambiatore anionico ed eluire con acqua raccogliendo in matracci due frazioni successive di 100 ml.

Alla prima frazione di eluato aggiungere 100 mg di acetato di piombo agitando fino a completa soluzione; in caso di intorbidamento o di formazione di precipitato, filtrare. Aggiungere quindi 100 mg di fosfato bisodico ed agitare. Dopo 15 min filtrare per filtro compatto: il liquido limpido ottenuto serve per la determinazione del 2,3-butandiolo (Soluzione A).

Prelevare 20 ml della soluzione A e 20 ml della seconda frazione dell'eluato e porli in un pallone da distillazione, aggiungere circa 10 ml di acqua e distillare circa 30 ml nei quali passa tutto l'alcol ancora presente. Dopo raffreddamento travasare quantitativamente il residuo della distillazione in matraccio da 100 ml e portare a volume con acqua.

Questa soluzione serve per la determinazione del glicerolo (soluzione B).

5.2 *Dosaggio dei polialcoli.*

5.2.1 *Dosaggio del glicerolo.*

Porre 10 ml della soluzione B in una beuta da 50 ml; aggiungere 5 ml della soluzione di periodato sodico 0,05 M ed agitare.

Dopo 5 min aggiungere, agitando dopo ogni aggiunta, 5 ml della soluzione di idrossido di sodio e 5 ml della soluzione di fluoruglucina.

Leggere rapidamente, a 460 nm in vaschetta da 10 mm contro acqua, il massimo valore raggiunto dalla DO.

5.2.2 *Dosaggio del 2,3-butandiolo.*

Porre in una beuta da 50 ml: 10 ml della soluzione A, 5 ml della soluzione di acetato sodico, 5 ml della soluzione di periodato sodico 0,1 M e agitare.

Attendere 2 min e quindi aggiungere, agitando ogni volta, 5 ml della soluzione di nitroprussiato sodico e 5 ml della soluzione di piperidina.

Leggere rapidamente, a 570 nm in vaschetta da 10 mm contro acqua, il massimo valore raggiunto dalla DO.

5.3 *Preparazione delle curve di taratura.*

5.3.1 *Curva di taratura per il glicerolo.*

Preparare 4 soluzioni contenenti rispettivamente 15, 30, 50, 80 mg/l di glicerolo. Su 10 ml di ciascuna soluzione eseguire la reazione come descritto in 5.2.1 e costruire la curva di taratura con i valori delle DO ottenuti.

5.3.2 *Curva di taratura per il 2,3-butandiolo.*

Preparare 4 soluzioni contenenti rispettivamente 10, 20, 30, 40 mg/l di 2,3-butandiolo. Su 10 ml di ciascuna soluzione eseguire la reazione come descritto in 5.2.2 e costruire la curva di taratura con i valori delle DO ottenuti.

6. Espressione dei risultati

Si esprimono in grammi di glicerolo e di 2,3-butandiolo per litro.

7. Osservazioni

7.1 Dopo ogni determinazione occorre rigenerare la colonna cationica con 100 ml di acido cloridrico 1 N e quella anionica con 100 ml di idrossido di sodio 2 N, lavando poi in entrambi i casi con acqua distillata sino a neutralità dell'effluente.

7.2 Il dosaggio del glicerolo può risultare errato per eccesso in presenza di sorbitolo e di mannitolo.

Quando lo si giudichi Necessario occorrerà ricercare questi polialcoli con il metodo cromatografico descritto in VIII.

XI - ACIDO MALICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'acido malico nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

L'acido malico, separato dal vino usando uno scambiatore anionico, viene dosato fluorimetricamente dopo reazione con orcinolo in presenza di acido solforico.

3. Reattivi

Essendo le reazioni fluorimetriche assai sensibili a varie impurezze è indispensabile usare acqua distillata (non solo deionizzata) per preparare tutte le soluzioni e non filtrare le medesime per carta. Altrettanto dicasi per l'acqua da impiegare nelle diluizioni.

3.1 *Acido acetico: soluzione 2 N.*

3.2 *Scambiatore anionico forte, 100-200 mesh in forma acetata, conservato sotto acido acetico 1 N (AG 1-X8 acetate form - della Bio-Rad Laboratories o equivalente).*

Dovendo trasformare in forma acetata le usuali resine anioniche forti del commercio, fornite normalmente in forma cloruro, procedere nel modo seguente: rigenerare la resina col procedimento in colonna con una soluzione, preparata con acqua bollita di recente e raffreddata, al 4-5% di carbonato o bicarbonato ammonico, sino a scomparsa della reazione dei cloruri nell'eluato; 10 volumi di soluzione sono di solito sufficienti.

Travasare la resina in un ampio bicchiere, lavandola per decantazione alcune volte con acqua, quindi trattarla a più riprese con acido acetico 1:4 caldo sino a scomparsa dell'effervescenza; conservare sotto acido acetico 1 N.

3.3 *Sodio solfato: soluzione 0,5 M.*

3.4 *Orcinolo-soluzione concentrata: sciogliere 80 mg di orcinolo in 100 ml di acido solforico 2,5 N (la soluzione è stabile alcuni mesi se conservata in frigorifero).*

3.5 *Orcinolo-reattivo: introdurre 2 ml della soluzione 3.4 in matraccio* da 25 ml e portare a volume con acido solforico concentrato aggiungendolo con cautela.

Il reattivo va preparato al momento dell'uso.

3.6 *Acido malico.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Apparecchio per misure di fluorescenza.*

Lunghezza d'onda di eccitazione 365 nm.

Lunghezza d'onda della fluorescenza 445 nm.

4.2 *Colonna cromatografica in vetro del diametro interno di 6 mm, altezza utile 60 mm, munita di serbatoio della capacità di 50-60 ml.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione della colonna.*

Far defluire lo scambiatore 3.2, sospeso in acido acetico 1 N, nella colonna munita al fondo di un batuffolo di lana di vetro, fino ad ottenere un letto di 55-60 mm.

5.2 *Separazione degli acidi.*

Introdurre 5 ml di prodotto limpido in matraccio da 50 ml; aggiungere 25 ml di acido acetico 2 N e completare al tratto con acqua distillata.

Dopo agitazione prelevare 10 ml della soluzione, corrispondenti ad 1 ml del prodotto in esame, e introdurli nel serbatoio sovrastante la colonna.

Lasciar defluire il liquido e lavare con 50 ml della soluzione di acido acetico 2 N.

Defluito l'acido acetico, eluire gli anioni trattenuti con 50 ml della soluzione di sodio solfato raccogliendo l'eluato in un matraccio da 100 ml e portando a volume con acqua.

Effettuare le necessarie diluizioni con acqua in modo da avere nella soluzione finale non più di 5 µg/ml di acido malico.

5.3 *Dosaggio dell'acido malico.*

Introdurre 1 ml della soluzione ottenuta in 5.2 in un tubo da saggio munito di tappo smerigliato e tirare a secco sotto vuoto a 60-70°C.

Aggiungere 3 ml di reattivo 3.5 e porre in bagno d'acqua bollente per 10 min. Raffreddare sotto acqua corrente fino a temperatura ambiente, aggiungere 7 ml di acido solforico concentrato e omogeneizzare con molta cura il liquido. Trasferire mediante pipetta il liquido nella vaschetta del fluorimetro ed effettuare la misura tarando lo strumento indicatore su fondo scala, o su altro valore ritenuto opportuno, con una soluzione ottenuta applicando lo stesso procedimento su 1 ml di una soluzione di acido malico contenente 5 µg/ml.

Dalla curva di taratura calcolare il contenuto in acido malico della soluzione sottoposta a dosaggio.

5.4 *Preparazione della curva di taratura.*

Sciogliere in acqua 500 mg di acido malico e portare al volume di 250 ml.

Trasferire 25 ml di questa soluzione in matraccio da 250 ml e portare a volume con acido acetico al 10% (l'acido acetico garantisce la conservazione della soluzione).

Prelevare con microburetta di precisione: 1, 2, 3, 4, 5 ml di questa soluzione e porli in 5 matracci da 200 ml portando a volume con acqua. Queste soluzioni contengono rispettivamente 1, 2, 3, 4, 5 µg/ml di acido malico.

In una serie di tubi da saggio muniti di tappo smerigliato introdurre 1 ml esattamente misurato di ciascuna delle soluzioni e procedere come in 5.3.

Tarare lo strumento di misura con la soluzione contenente 5 µg/ml di acido malico e con i valori letti anche per le altre concentrazioni costruire la curva di taratura.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di acido malico per litro.

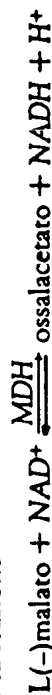
XII - ACIDO L(-)MALICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'acido L(-)malico nei mosti e nei vini.

2. Principio del metodo

Il NAD^+ (nicotinammide-adenin-dinucleotide) determina l'ossidazione del L(-)malato ad ossalacetato in presenza della malico-deidrogenasi (*MDH*) secondo la reazione

$$\text{L(-)malato} + NAD^+ \underset{}{\overset{MDH}{\rightleftharpoons}} \text{ossalacetato} + NADH + H^+$$

In ambiente alcalino e in presenza di idrazina, che sottrae all'equilibrio l'ossalacetato, la reazione procede da sinistra verso destra con completezza. La quantità di *NADH* formata durante la reazione è stechiometrica rispetto alla quantità di L(-)malato.

L'aumento della concentrazione del *NADH* è determinato spettrofotometricamente nell'*UV*.

3. Reattivi (*)

3.1 *Soluzione tampone pH 9,6.*

Sciogliere in matraccio da 100 ml 7,5 g di glicina, 5,2 g di idrazina solfato e 0,2 g di acido etilendiammino-tetracetico, in 51 ml di soluzione di *NaOH 2N* e portare a volume con acqua. Portare il *pH* a 9,6 con acido acetico o con soluzione di *NaOH*.

3.2 *NAD (nicotinammide-adenin-dinucleotide).*

Sciogliere 40 mg di *NAD* in 1,0 ml di H_2O.

3.3 *MDH (Malico-deidrogenasi).*

Sospensione o soluzione del commercio (5 mg/ml).

3.4 *Acido L(-)Malico.*

(*) Possono essere usati i reattivi disponibili in commercio in confezioni pronte per l'uso.

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofotometro fornito di vaschette di quarzo (percorso ottico 10 millimetri).*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

Diluire il prodotto in modo che la concentrazione di L(-)malato sia compresa fra 1 e 10 μg/ml.

5.2 *Dosaggio dell'acido L(-)malico.*

In una vaschetta di quarzo (*A*) porre nell'ordine:
- 0,50 ml di mosto o di vino diluito
- 0,10 ml di soluzione di NAD^+
- 2,00 ml di soluzione tampone
- 0,02 ml di acqua distillata.

Agitare con una adatta bacchettina di vetro.

In una cuvetta (*B*) porre nell'ordine:
- 0,50 ml di mosto o di vino diluito
- 0,10 ml di soluzione di NAD^+
- 2,00 ml di soluzione tampone
- 0,02 ml di dispersione di malico-deidrogenasi.

Agitare con adatta bacchettina di vetro.

Effettuare la misura della DO alla lunghezza d'onda di 340 nm, rilevando la differenza di assorbimento della cuvetta (*B*) rispetto alla cuvetta (*A*) dopo 9 minuti dall'aggiunta della *MDH*; è opportuno effettuare una serie di altre 2 misure ad intervalli di 3', fino ad ottenere una differenza di assorbimento (ΔE) costante per circa 3'.

6. Espressione del risultato

Si esprime in g/l calcolati con la formula:

$$\frac{\Delta E \cdot V \cdot PM}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot F$$

dove:

ΔE — differenza di densità ottica

V — volume finale nella vaschetta (ml)

PM — peso molecolare dell'acido malico
ε — coefficiente di estinzione di *NADH* (6,22 alla λ di 340 nm)
d — percorso ottico (cm)
v — volume di campione (ml)
F — fattore di diluizione.

XIII - ACIDO LATTICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'acido lattico nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

L'acido lattico, insieme al malico ed al tartarico, viene fissato su una resina scambiatrice fortemente basica in forma di acetato, e successivamente eluito con una soluzione di solfato di sodio. L'acido lattico contenuto nell'eluato viene ossidato con solfato di cerio ad aldeide acetica, che è determinata misurando la colorazione violetta che si sviluppa dalla reazione con nitroprussiato di sodio e piperidina.

3. Reattivi

3.1 *Acido acetico: soluzione al 30%.*

3.2 *Scambiatore anionico fortemente basico (Merck III o equivalente).*

Lo scambiatore deve essere sotto forma di acetato. A tale scopo versare 200 ml della soluzione di acido acetico al 30% su 100 g di scambiatore, lasciando in contatto per 24 h prima dell'impiego. Questa quantità di scambiatore serve per 30 determinazioni; non è rigenerabile.

3.3 *Acido acetico: soluzione allo 0,5%.*

3.4 *Sodio solfato anidro: soluzione al 7,1% (0,5 M).*

3.5 *Acido solforico: soluzione 2 N.*

3.6 *Cerio solfato (ico) tetraidrato: soluzione 0,1 M in acido solforico 0,7 N.*

Sciogliere 40,431 g di solfato di cerio in 350 ml della soluzione di acido solforico 2 N, senza riscaldare per evitare la formazione di ossido di cerio insolubile; portare al volume di 1 l con acqua.

3.7 *Sodio idrossido: soluzione 2,5 N.*

3.8 *Sodio acetato: soluzione al 27%.*

3.9 *Sodio nitroprussiato: soluzione al 2%.*

La soluzione deve essere mantenuta ben tappata e al buio; non si conserva per più di otto giorni.

3.10 *Piperidina: soluzione al 10% (v/v).*

3.11 *Acido lattico: soluzione 1 N.*
3.12 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Colonna cromatografica di vetro della lunghezza di 300 mm e di diametro interno di 10 mm, munita di rubinetto e di setto poroso, e sormontata da un serbatoio di vetro della capacità di almeno 100 ml.*

4.2 *Spettrofotometro o fotocolorimetro.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione della colonna cromatografica.*

Introdurre nella colonna di vetro circa 10 ml della sospensione in acido acetico dello scambiatore. Assestare della lana di vetro sulla superfice dello scambiatore per evitarne la rimozione durante i lavaggi.

5.2 *Separazione dell'acido lattico.*

Lasciare defluire il liquido fino a 2-3 mm al di sopra del tampone di lana di vetro. Aggiungere 10 ml della soluzione di acido acetico allo 0,5% e segnare con una matita vetrografica la posizione del livello del liquido. Aprire completamente il rubinetto e lasciare defluire nuovamente il liquido fino a 2-3 mm al di sopra del tampone di lana di vetro. Ripetere ancora 4 volte questa operazione, riempendo ogni volta la colonna fino al segno.

Dopo l'ultimo lavaggio, versare sullo scambiatore 10 ml di prodotto; lasciare defluire goccia a goccia e riempire di nuovo fino al segno con la soluzione di acido acetico allo 0,50%; lasciare defluire alla stessa velocità e lavare ancora sette volte con 10 ml di acqua per volta, avendo cura all'ultimo lavaggio di chiudere il rubinetto quando il liquido si trova poco al di sopra del tampone di lana di vetro, innestare il serbatoio sulla colonna cromatografica e riempirlo con 100 ml della soluzione di solfato di sodio; eluire goccia a goccia gli acidi fissati sullo scambiatore, raccogliendo l'eluato in un matraccio da 100 ml.

5.3 *Dosaggio dell'acido lattico.*

Introdurre 10 ml di eluato in un tubo da saggio con tappo smerigliato, a pareti sottili e uniformi, e aggiungere 10 ml della soluzione di solfato di cerio; agitare e mantenere il tubo per 10 min esatti in un bagno-maria, già termostatato a 65°C.

Raffreddare immediatamente in acqua corrente; quindi aggiungere 5 ml della soluzione di idrossido di sodio 2,5 N; mescolare con cura e filtrare su filtro a pieghe. Prelevare 15 ml del filtrato e trasferirli in un cilindro da 50 ml a tappo smerigliato contenente una miscela di 5 ml della soluzione di acetato di sodio e 2 ml di acido solforico 2 N.

Aggiungere 5 ml della soluzione di nitroprussiato di sodio e mescolare con cura. Aggiungere ancora 5 ml della soluzione di piperidina; mescolare ed introdurre immediatamente il liquido nella vaschetta del colorimetro.

Effettuare rapidamente una serie di misure della DO a 570 nm, in confronto ad una identica vaschetta vuota e scegliere il valore massimo ottenuto. Infatti l'intensità della colorazione aumenta per poi diminuire velocemente.

Se la concentrazione dell'acido lattico è tale da non permettere il dosaggio nelle condizioni prescritte, ripetere la determinazione diluendo opportunamente l'eluato con la soluzione di solfato di sodio.

5.4 *Preparazione della curva di taratura.*

Prelevare 10 ml della soluzione 1 N di acido lattico; aggiungere 10 ml della soluzione 1 N di idrossido di sodio e portare al volume di 1 l con la soluzione di solfato di sodio. Prelevare 5-10-15-20 e 25 ml in 5 matracci da 100 ml e portare a volume con la soluzione di solfato di sodio. Le soluzioni così ottenute contengono 0,045 - 0,090 - 0,135 - 0,180 - 0,225 g/l di acido lattico. Prelevare da ogni matraccio 10 ml di soluzione e procedere come in 5.3. Con i valori massimi delle DO costruire la curva di taratura.

6. Espressione del risultato

6.1 Si esprime in grammi di acido lattico per litro.

7. Osservazioni

I prodotti con un contenuto in anidride solforosa totale superiore a 250 mg/l, possono presentare un certo tenore in acido aldeido solforoso che viene valutato come acido lattico.

In tal caso occorre correggere il risultato ottenuto con quello ricavato dalla seguente operazione complementare.

In un tubo da saggio con tappo smerigliato, mescolare 15 ml di eluato con 5 ml della soluzione di acetato di sodio e 2 ml di acido solforico 1,55 N (diluire a 100 ml con acqua 77,5 ml di acido solforico 2 N). Aggiungere 5 ml della

soluzione di nitroprussiato di sodio e 5 ml della soluzione di piperidina. Mescolare accuratamente e misurare la DO massima nelle condizioni descritte in 5.3.

Il contenuto effettivo di acido lattico nel vino, in g/l si calcola con la formula:

$$L - 0{,}4 \cdot B$$

dove:

L — valore apparente dell'acido lattico (g/l)

B — complesso aldeido-solforoso espresso in acido lattico (g/l).

XIV - ACIDO L (+) LATTICO
ACIDO D (-) LATTICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'ac. L (+) lattico e dell'ac. D (-) lattico, nel mosto, nel vino e nell'aceto.

A ACIDO L (+) LATTICO

2. Principio del metodo

L (+) lattato viene ossidato a piruvato dal NAD con reazione enzimatica catalizzata dalla L-lattato deidrogenasi (*L-LDH*)

$$L\,(+)\ Lattato + NAD^{+} \xrightleftharpoons{L\text{-}LDH} piruvato + NADH + H^{+}$$

La quantità di *NADH* formatosi viene misurata dall'aumento di estinzione a 340 nm.

3. Reattivi (*)

3.1 *Soluzione tampone Idrazina/glicina.*

Sciogliere 11,4 g di glicina e 25 ml di idrazina idrato in 200 ml di acqua (controllare ed eventualmente aggiustare il *pH* che deve essere 9,0) e portare al volume di 300 ml con acqua.

3.2 NAD *(Nicotinamide-adenin-dinucleotide).*

Sciogliere 150 mg di *NAD* in 5 ml di acqua.

3.3 *L-LDH (L-Lattato deidrogenasi).*

Preparazione commerciale (5 mg/ml).

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofotometro fornito di vaschette di quarzo (percorso ottico 10 millimetri).*

(*) Possono essere usati i reattivi disponibili in commercio in confezioni pronte per l'uso.

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

Diluire il prodotto secondo la tabella seguente:

Quantità stimata di L (+) lattato per litro	Diluizione con acqua	Fattore di diluizione F
0,1 g	—	1
0,1 - 1,0 g	1 + 9	10
1,0 - 10,0 g	1 + 99	100

5.2 *Dosaggio dell'acido L (+) lattico.*

In una vaschetta di quarzo (*A*) porre nell'ordine:
- 2,50 ml di tampone (3.1)
- 0,20 ml di soluzione di *NAD* (3.2)
- 0,20 ml del campione.

Agitare con una bacchettina di vetro.
Contemporaneamente in un'altra vaschetta (*B*) porre:
- 2,50 ml di tampone (3.1)
- 0,20 ml di soluzione di *NAD* (3.2)
- 0,20 ml di acqua.

Agitare con una bacchettina di vetro.
Leggere il valore dell'estinzione (E_1) della vaschetta A usando la vaschetta *B* come bianco.

Aggiungere in entrambe le vaschette 0,01 ml della sospensione *L-LDH* (3.4), mescolare con la bacchettina di vetro e porre in bagno d'acqua a 25°C per 60 min (o a 37°C per 30 min).

Leggere il valore dell'estinzione (E_2) della vaschetta *A* rispetto alla *B*.

6. Espressione del risultato

Si esprime in *g/l* calcolati con la formula:

$$\frac{\Delta E \cdot V \cdot PM}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot F$$

dove:
ΔE — $E_2 - E_1$
V — volume finale nella vaschetta (2,92 ml)
PM — peso molecolare dell'acido lattico (90,1)
ε — coefficiente di estinzione di *NADH* (6,22 a 340 nm)
d — percorso ottico (cm)
v — volume di campione (ml)
F — fattore di diluizione.

B ACIDO D (–) LATTICO

2'. Principio del metodo

D (–) lattato viene ossidato a piruvato dal *NAD* con reazione enzimatica catalizzato dallo D–lattato deidrogenasi (*D-LDH*)

$$D\ (-)\ Lattato + NAD^+ \xrightleftharpoons{D\text{-}LDH} \text{piruvato} + NADH + H^+$$

La quantità di NADH formatosi viene misurata dall'aumento di estinzione a 340 nm.

3'. Reattivi (*)

3'.1 *Soluzione tampone Idrazina/glicina (vedi 3.1).*
3'.2 *NAD (Nicotinamide-adenin-dinucleotide) (vedi 3.2).*
3'.3 *D–LDH (D–Lattato deidrogenasi) preparazione commerciale.*

4'. Apparecchiatura (vedi 4)

5'. Procedimento

5'.1 *Preparazione del campione* (vedi 5.1).

5'.2 *Dosaggio dell'acido D (–) lattico.*

In una vaschetta di quarzo (*A*) porre nell'ordine:
- 3,00 ml di tampone (3'.1)
- 0,20 ml di soluzione di *NAD* (3'.2)
- 0,10 ml del campione.

Agitare con una bacchettina di vetro.

(*) Possono essere usati reattivi disponibili in commercio in confezioni pronte per l'uso.

Contemporaneamente in un'altra vaschetta (*B*) porre:

- 3,00 ml di tampone
- 0,20 ml di soluzione di *NAD*
- 0,10 ml di acqua.

Agitare con una bacchettina di vetro.

Leggere il valore dell'estinzione (E_1) della vaschetta *B* usando la *A* come bianco. Aggiungere in entrambe le vaschette 0,01 ml di sospensione di *D-LDH*; agitare con la bacchettina di vetro e leggere il valore dell'estinzione della vaschetta *A* rispetto alla *B* ripetendo la lettura ad intervalli di tempo fino ad avere un valore costante (E_2) (occorrono circa 50 min.).

6'. Espressione del risultato

Si esprime in *g/l* calcolati con la formula

$$\frac{\Delta E \cdot V \cdot PM}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot F$$

dove:

ΔE = $E_2 - E_1$
V = volume finale nella vaschetta (3,31 ml)
PM = peso molecolare acido lattico (90,1)
ε = coefficiente di estinzione di *NADH* (6,22 a 340 nm)
d = percorso ottico (cm)
v = volume di campione (ml)
F = fattore di diluizione.

XV - ACIDO SUCCINICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'acido succinico nel mosto parzialmente fermentato e nel vino.

2. Principio del metodo

L'acido succinico viene fissato su una resina scambiatrice di anioni fortemente basica e successivamente eluito con una soluzione di carbonato ammonico. Dopo ossidazione permanganica delle sostanzee estranee ed eliminazione degli acidi volatili per distillazione in corrente di vapore, l'acido succinico viene estratto con etere e dosato per argentometria.

3. Reattivi

3.1 *Scambiatore anionico fortemente basico.*
(Dowex 2-80 mesh; Amberlite IRA-400 o equivalente).
3.2 *Sodio idrossido: soluzione N.*
3.3 *Acido cloridrico: soluzione N.*
3.4 *Ammonio carbonato: soluzione al 10%.*
3.5 *Acido solforico: soluzione diluita 1+2 (v/v).*
3.6 *Potassio permanganato: soluzione satura.*
3.7 *Sale di Mohr* ($FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$)*: soluzione contenente 125 g/l + 20 ml di acido solforico.*
3.8 *Etere etilico.*
3.9 *Argento nitrato: soluzione 0,1 N.*
3.10 *Potassio solfocianato: soluzione 0,1 N.*
3.11 *Acido nitrico: soluzione diluita (1+1).*
3.12 *Allume ferrico-ammonico: soluzione satura.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Colonna cromatografica in vetro di diametro interono di mm 10 e della lunghezza di cm 50, munita di rubinetto e di setto poroso.*
4.2 *Estrattore continuo per liquidi.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione della colonna cromatografica.*

Porre nella colonna 35 ml dello scambiatore anionico. Procedere a due lavaggi alternati della resina con le soluzioni di idrossido di sodio e di acido cloridrico. Far percolare quindi la soluzione di carbonato ammonico fino a scomparsa della reazione dei carbonati (saggio con soluzione di acetato di piombo).

5.2 *Separazione dell'acido succinico.*

Porre 50 ml del campione da analizzare in un bicchiere da 250 ml. Aggiungere un volume di soluzione N di idrossido di sodio uguale a 1/2 (n-1) ml, essendo *n* il volume di soluzione 0,1 N di idrossido di sodio utilizzati per titolare l'acidità totale di 10 ml di prodotto.

Far percolare questo liquido attraverso la colonna di resina alla velocità di 1 goccia ogni 2 secondi. Lavare la colonna con 50 ml di acqua con lo stesso flusso.

Eluire gli acidi fissati sulla resina con 100 ml della soluzione di carbonato ammonico facendolo percolare sempre alla velocità di 1 goccia ogni 2 secondi. All'eluato raccolto aggiungere 1 ml della soluzione di idrossido di sodio e concentrare fino a metà volume su bagnomaria.

Dopo raffreddamento aggiungere 2 ml della soluzione di acido solforico, 5 ml della soluzione di permanganato di potassio e portare all'ebollizione.

Mano a mano che il permanganato si decolora, aggiungere altro permanganato fino a che il liquido, concentrato a 10-20 ml, rimane di colore bruno.

Ridurre l'eccesso di permanganato e di ossidi di manganese con la soluzione di sale di Mohr e allontanare gli acidi volatili per distillazione in corrente di vapore concentrando a meno di 20 ml.

Introdurre quantitativamente il residuo in un estrattore per liquidi ed estrarre con etere per 6-9 ore.

Terminata l'estrazione aggiungere all'etere qualche ml di acqua ed evaporare l'etere.

5.3 *Dosaggio dell'acido succinico.*

Portare il residuo in matraccio da 100 ml. Neutralizzare in presenza di fenolftaleina dapprima con soluzione di idrossido di sodio N raggiungendo il viraggio con soluzione 0,1 N.

Aggiungere 1 goccia di acido acetico 0,1 N (il mezzo ılta leggermente acido: pH 6,7).

Aggiungere 25 ml della soluzione di nitrato d'argento, portare a 100 ml e dopo almeno 15 minuti filtrare. Su 50 ml di filtrato dosare il nitrato d'argento in eccesso con la soluzione di solfocianato di potassio in presenza di 5 ml di acido nitrico (1+1) e di 5 ml della soluzione di allume ferrico ammonico.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di acido succinico per litro calcolati con la formula

$$0{,}118 \cdot (25-2n)$$

dove:

n — ml di soluzione di solfocianato potassico impiegati.

XVI - SOLFATI

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dei solfati nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

Il metodo consiste nella determinazione ponderale dei solfati come solfato di bario, previa eliminazione dell'anidride solforosa.

3. Reattivi

3.1 *Acido cloridrico 2 N.*
3.2 *Bario cloruro biidrato: soluzione al 20%.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Beuta da 500 ml munita di imbuto cilindrico da 100 ml con rubinetto e di tubo di scarico per il vapore.*
4.2 *Disco metallico avente diametro di 15 cm con un foro circolare del diametro di 8 cm.*
4.3 *Crogiolo di platino del diametro di 30 mm e dell'altezza di 35 mm circa.*

5. Procedimento

Porre la beuta sul disco metallico e versarvi 50 ml di acqua e 1 ml di acido cloridrico concentrato; fare bollire la soluzione per scacciare l'aria.

Mantenendo il liquido all'ebollizione, introdurre lentamente 100 ml del campione mediante l'imbuto. Proseguire l'ebollizione fino a ridurre il volume del liquido a circa 100 ml, per eliminare l'anidride solforosa.

Travasare quantitativamente il residuo in un bicchiere da 400 ml risciacquando con acqua fino al volume di 200 ml circa. Aggiungere 5 ml di acido cloridrico 2 N; portare all'ebollizione, e versare goccia a goccia 5 ml di soluzione di cloruro di bario.

Lasciare depositare il precipitato per 2 h su bagno-maria bollente. In presenza di limitate quantità di precipitato, lasciarlo inoltre depositare a freddo per una notte. Filtrare attraverso un filtro senza ceneri; lavare il precipitato per 5 volte con 20 ml di acqua distillata per volta; essiccare il filtro ed il precipitato nel crogiolo di platino precedentemente tarato; bruciare il filtro, calcinare il precipitato fino a peso costante; e pesare dopo raffreddamento.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di solfato di potassio per litro calcolati con la formula:

$$\frac{0,7465 \cdot p \cdot 1000}{V}$$

dove:
p = peso del solfato di bario
V = volume del campione.

7. Osservazioni

Per i campioni non contenenti anidride solforosa, prelevare 100 ml in un bicchiere da 400 ml, aggiungere 100 ml di acqua, 10 ml di acido cloridrico 2 N, portare a ebollizione, e procedere come in 5, a partire dall'aggiunta del cloruro di bario.

I prodotti molto zuccherini devono essere diluiti fino ad un tenore in zuccheri non superiore a 100 g/l.

XVII - CLORURI

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dei cloruri nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

Lo ione cloro viene fissato su una resina scambiatrice fortemente basica, successivamente eluito con una soluzione di acido nitrico, e quindi dosato per argentometria.

3. Reattivi

3.1 *Scambiatore anionico fortemente basico (Dowex 1-X2, 50-100 mesh, o equivalente).*
3.2 *Acido nitrico: soluzione 1 N.*
3.3 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*
3.4 *Acido nitrico: diluito 1 + 5.*
3.5 *Potassio permanganato: soluzione satura.*
3.6 *Acqua ossigenata: soluzione a 3 volumi (9,1 g/l).*
3.7 *Ferro ammonio solfato (ico): soluzione al 15%.*
3.8 *Etere etilico.*
3.9 *Argento nitrato: soluzione 0,1 N.*
3.10 *Potassio solfocianuro: soluzione 0,1 N.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Colonna cromatografica di vetro della lunghezza di 300 mm e di diametro interno di 10 mm, munita di rubinetto e di setto poroso.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione della colonna cromatografica.*

Introdurre nella colonna cromatografica 15 ml di scambiatore sospeso in acqua. Effettuare due cicli completi di rigenerazione con passaggi alternati delle soluzioni 1 N di idrossido di sodio e di acido nitrico. Lavare con 50 ml di acqua.

5.2 *Separazione degli anioni.*

Percolare 50 ml di campione attraverso la colonna alla velocità di 15 ml per min; lavare con 50 ml di acqua; eluire gli anioni con 50 ml della soluzione di acido nitrico 1 N alla stessa velocità. Raccogliere l'eluato in una beuta da 250 ml. La colonna è pronta per un nuovo dosaggio, previo lavaggio con 50 ml di acqua.

5.3 *Dosaggio dei cloruri.*

Aggiungere all'eluato (vedere osservazioni) 10 ml di soluzione di solfato ferrico-ammonico, 20 ml di etere etilico, e 10 ml della soluzione di nitrato di argento 0,1 N. Titolare l'eccesso di nitrato di argento con la soluzione di solfocianuro di potassio 0,1 N, fino a colorazione rosso-mattone pallido.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di cloruro di sodio per litro, con la seguente formula:

$$\frac{5,845 \cdot (A - B)}{V}$$

dove:
A — ml di nitrato di argento 0,1 N
B — ml di solfocianuro di potassio 0,1 N
V — volume del campione.

7. Osservazioni

L'eluato di vini rossi può essere colorato. Pertanto, prima di effettuare il dosaggio, bisogna decolorarlo. A tale scopo aggiungere all'eluato, agitando, 10 ml di acido nitrico diluito (1+5) e 3-5 gocce della soluzione di permanganato di potassio. Agitare e lasciare in riposo fino a scomparsa della colorazione viola. Se la colorazione persiste, decolorare con poche gocce della soluzione di acqua ossigenata e procedere come in 5.3.

La quantità indicata di nitrato di argento (10 ml) è sufficiente per prodotti contenenti fino a 1 g/l di cloruro di sodio.

XVIII - FOSFATI

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dei fosfati nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

Dopo ossidazione nitrica, incenerimento e insolubilizzazione della silice, l'acido fosforico viene determinato gravimetricamente per precipitazione come fosfomolibdato di chinolina.

3. Reattivi

3.1 *Acido cloridrico* (p.sp = 1,18 - 1,19).

3.2 *Acido cloridrico* ~ 3 N.

3.3 *Molibdato di chinolina (reattivo precipitante).*

– Sciogliere 70 g di molibdato di ammonio in 150 ml di acqua (soluzione *a*).

– Sciogliere 11,60 g di acido citrico monoidrato in 150 ml di acqua ed aggiungere 85 ml di acido nitrico concentrato (soluzione *b*).

– Aggiungere agitando la soluzione *a* alla soluzione *b* (soluzione *c*).

– Aggiungere alla soluzione *c* 100 ml di acqua, 35 ml di acido nitrico concentrato e quindi 5 ml di chinolina pura distillata di recente. Mescolare e lasciare in riposo per 12 h. Filtrare, su un crogiolo di vetro a setto filtrante di porosità n. 4, tutto il liquido senza lavare e ripassare eventualmente le prime porzioni fino ad ottenere un filtrato limpido (soluzione *d*).

– Versare la soluzione *d* in un matraccio da 1000 ml; aggiungere 280 ml di acetone e portare a volume con acqua. Questa soluzione, che costituisce il reattivo precipitante, si conserva 1 mese al buio e lontano da fonti di calore.

4. Apparecchiatura

Normale attrezzatura di laboratorio.

5. Procedimento

5.1 *Dosaggio dell'acido fosforico.*

Porre 50 ml di prodotto, in capsula di platino, a evaporare su *b m* bollente. Quando il residuo è quasi secco aggiungere 2 ml di acido nitrico e porre la capsula per 1 h su una piastra riscaldante. Porre quindi la capsula in muffola a 600-650°C fino ad ottenimento di ceneri bianche.

Riprendere le ceneri con 2 ml di acido nitrico ed evaporare a secco su piastra riscaldante ripetendo questo trattamento con acido nitrico per insolubilizzare la silice.

Riprendere le ceneri con 10 ml di acido cloridrico circa 3 N riscaldando leggermente. Filtrare su filtro compatto senza ceneri, lavare la capsula e il filtro con 75 ml di acqua distillata raccogliendo filtrato e acque di lavaggio in beuta da 500 ml.

Versare senza agitare 50 ml di reattivo precipitante, coprire con un vetro da orologio e porre la beuta su una piastra riscaldante fino al raggiungimento della temperatura di circa 75°C (ebollizione incipiente) che si mantiene per qualche secondo.

Allontanare la beuta dalla piastra e lasciar raffreddare per 30 min. agitando 3 o 4 volte durante il raffreddamento.

Raccogliere il precipitato su un crogiolo filtrante di porosità n. 4, preventivamente tarato, lavando 4 o 5 volte per decantazione.

Seccare in stufa a 250° ± 20°C per 1 h.

Pesare dopo raffreddamento in essiccatore.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di ione fosforico per litro, calcolati con la formula:

$$\frac{p \cdot 0{,}0429 \cdot 1000}{V}$$

dove:

p = peso di fosfomolibdato di chinolina (g)
V = volume di prodotto utilizzato per l'analisi (ml).

XIX - NITRATI

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dei nitrati nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

I nitrati vengono ridotti a nitriti dalla spugna di cadmio che si forma dalla reazione fra polvere di zinco ed acetato di cadmio. I nitriti vengono poi determinati colorimetricamente con il reattivo di Griess.

3. Reattivi

3.1 *Ammonio idrato: soluzione al 25%.*

3.2 *Zinco in polvere.*

3.3 *Cadmio acetato: soluzione al 5%.*

3.4 *Reattivo di Griess I:*

Sciogliere in un matraccio da 250 ml, 1,5 g di acido solfanilico in 50 ml di acido acetico glaciale e portare a volume con acqua. Preparare al momento dell'uso.

3.5 *Reattivo di Griess II:*

Sciogliere in un matraccio da 250 ml, 75 mg di naftilammina in 50 ml di acido acetico glaciale e portare a volume con acqua. Preparare al momento dell'uso.

3.6 *Acido acetico al 20%.*

4. Apparecchiatura

Spettrofotometro o fotocolorimetro.

5. Procedimento

5.1 *Dosaggio dei nitrati.*

In un matraccio da 50 ml porre 5 ml di vino o di mosto, 5 ml di acqua e 2 ml dell'idrato di ammonio. Aggiungere, mediante un imbuto asciutto, 0,5 g di polvere di zinco, agitare vigorosamente ed aggiungere immediatamente 1 ml della soluzione di acetato di cadmio, evitando di bagnare le pareti. Lasciare a riposo per 5 min, senza agitare. Portare a volume e filtrare. A 10 ml di filtrato aggiungere 10 ml della miscela in parti uguali dei reattivi di Griess I e II. Dopo 15 min. eseguire la misura della DO della soluzione di colore rosso a 530 nm, in confronto con la prova in bianco, preparata aggiungendo a 10 ml di filtrato, 10 ml della soluzione di acido acetico.

5.2 *Preparazione della curva di taratura.*

Sciogliere 0,8153 g di nitrato di potassio, previamente seccato in stufa a 105°C, in un matraccio da 500 ml e portare a volume con acqua. Diluire con acqua 25 ml di questa soluzione in un matraccio da 250 ml. Prelevare 2,5 - 5 - 10 - 20 - 30 ml in 5 matracci da 100 ml e portare a volume con acqua.

Tali soluzioni contengono 2,5 - 5 - 10 - 20 - 30 mg/l di ione nitrico. Su 5 ml di ciascuna di queste soluzioni eseguire la reazione colorimetrica come in 5.1. Con i valori delle DO si costruisce la curva di taratura che segue la legge di Lambert-Beer.

6. Espressione del risultato

Si esprime in milligrammi di ione nitrico NO_3^- per litro, oppure in milligrammi di N_2O_5 moltiplicandolo per 0,871.

7. Osservazioni

Verificare che i reattivi usati siano esenti da nitrati.

XX - BORATI

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dei borati nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

Dopo mineralizzazione umida con acido solforico e peridrolo il boro viene determinato colorimetricamente mediante un complesso colorato che si forma in mezzo solforico con la 1-1' diantrimide.

3. Reattivi

3.1 *Acido solforico 95-97% (p.s. ~ 1,84).*
3.2 *Peridrolo: soluzione al 30% (100 volumi).*
3.3 *Idrossilammina cloridrato.*
3.4 *1-1' Diantrimide: soluzione allo 0,025% in acido solforico 95-97% (da prepararsi al momento dell'uso).*
3.5 *Acido borico.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofotometro o fotocolorimetro.*

5. Procedimento

5.1 *Dosaggio del boro.*

Porre in un tubo da saggio provvisto di tappo smerigliato 0,5 ml del prodotto da esaminare, 5 ml di acido solforico, 0,1 - 0,3 ml di peridrolo e riscaldare a 100°C per 60 min. Aggiungere al liquido incolore, mediante un imbuto, 100 mg di cloridrato di idrossilammina per distruggere l'eccesso di peridrolo e riscaldare di nuovo a 100°C per 30 min. Poiché all'inizio si ha abbondante sviluppo di gas, non chiudere il tubo da saggio. Dopo raffreddamento aggiungere 3 ml del reattivo alla 1-1' diantrimide, mescolare accuratamente e lasciare per 3 h il tubo da saggio tappato, in stufa a 90°C.

Dopo raffreddamento misurare la DO a 620 nm in confronto ad una prova in bianco effettuata allo stesso modo su 0,5 ml di acqua.

5.2 *Costruzione della curva di taratura.*

Sciogliere 571,5 mg di acido borico in acqua e portare al volume di 100 millilitri.

Diluire con acqua 10 ml di questa soluzione a 100 ml. Porre in 4 matracci da 50 ml rispettivamente 1, 2, 3, 4 ml della soluzione così ottenuta e portare a volume con acqua.

Queste soluzioni contengono 1, 2, 3, 4 μg di boro in 0,5 ml.

Prelevare 0,5 ml di ciascuna soluzione e porli in altrettanti tubi da saggio; in un quinto tubo da saggio porre 0,5 ml di acqua per la prova in bianco.

Procedere come in 5.1.

Con i valori delle DO costruire la curva di taratura.

6. Espressione del risultato

Si esprime in milligrammi di boro o in milligrammi di acido borico (fattore 5,71) per litro.

XXI - ACIDO ETILENDIAMMINOTETRACETICO E SUOI SALI

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerca dell'acido etilendiamminotetracetico e dei suoi sali nel vino.

2. Principio del metodo

Si basa sulla colorazione rosa violetta che si sviluppa con una soluzione di nitrato di cobalto.

3. Reattivi

3.1 *Potassio ferrocianuro: soluzione al 10%.*
3.2 *Zinco acetato: soluzione al 10%.*
3.3 *Carbone attivo decolorante.*
3.4 *Acido acetico: d — 1,05.*
3.5 *Cobalto nitrato: soluzione al 2%.*
3.6 *Acqua ossigenata: soluzione al 30%.*

4. Apparecchiatura

Spettrofotometro o fotocolorimetro.

5. Procedimento

Porre in un bicchiere da 150 ml, 50 ml di campione, 2,5 ml della soluzione di ferrocianuro di potassio e 5 ml della soluzione di acetato di zinco. Agitare e filtrare; al filtrato aggiungere 0,5 g di carbone decolorante e dopo 15 min filtrare. Aggiungere a 10 ml del filtrato, cinque gocce di acido acetico, due gocce della soluzione di nitrato di cobalto e riscaldare su bagnomaria bollente per 15 min. Raffreddare a circa 40°C e aggiungere 0,5 ml di acqua ossigenata; agitare e riscaldare a fiamma diretta fino a che non si sentono piccoli crepitii dovuti alla decomposizione dell'acqua ossigenata. Durante il raffreddamento si sviluppa una colorazione rosa violetta che raggiunge il suo massimo a temperatura ambiente.

La colorazione è stabile per alcune ore.

6. Osservazioni

È possibile eseguire un'analisi quantitativa per dosi superiori a 20 mg/l, misurando la densità ottica a 540 nm e riferendosi ad una curva di taratura.

XXII - ACIDO METATARTARICO

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerca dell'acido metatartarico nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

L'acido metatartarico reagisce con l'acetato di cadmio in ambiente debolmente acido, dando un precipitato insolubile in acqua, che scaldato con idrossido di sodio si decompone formando acido tartarico. Quest'ultimo reagendo con una soluzione di monovanadato di ammonio sviluppa una colorazione rossa.

3. Reattivi

3.1 *Cadmio acetato biidrato: soluzione al 5%.*

Sciogliere 5 g di acetato di cadmio in un matraccio da 100 ml con 1 ml di acido acetico glaciale e portare a volume con acqua.

3.2 *Sodio acetato: soluzione al 27%.*

3.3 *Ammonio monovanadato: soluzione al 2%.*

Sciogliere 10 g di monovanadato di ammonio in 150 ml di idrossido di sodio 1 N; travasare la soluzione in matraccio da 500 ml. Aggiungere 200 ml della soluzione di acetato di sodio e portare a volume con acqua.

3.4 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*

3.5 *Acido solforico: soluzione 2 N.*

3.6 *Etanolo a 96°.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Centrifuga a 5000 g/m.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

Centrifugare 50 ml di prodotto a 4000 g/m per 5 min; per i vini prelevare 40 ml di surnatante limpido; per i mosti prelevare 35 ml ed aggiungere 5 ml di etanolo; per i vini alcoolizzati prelevare 30 ml e aggiungere 10 ml di acqua.

5.2 *Ricerca dell'acido metatartarico.*

Introdurre dette quantità di liquido in provette da centrifuga ed aggiungere 5 ml di soluzione di acetato di cadmio; mescolare e lasciare in riposo per 10 min; centrifugare per 5 min ed allontanare con precauzione il surnatante. La formazione di un precipitato indica la presenza di acido metatartarico che viene confermata nel modo seguente: lavare il precipitato una volta con 10 ml di acqua, avendo cura di provocare il distacco del precipitato dal fondo della provetta. Aggiungere 0,2 ml di soluzione di acetato di cadmio e centrifugare nuovamente; decantare il liquido surnatante. Introdurre nella provetta da centrifuga 1 ml di idrossido di sodio 1 N e porre per 5 min su bagno-maria bollente.

Raffreddare; aggiungere 1 ml di acido solforico 2 N, 1 ml di soluzione di monovanadato di ammonio e travasare il tutto in provetta. Preparare contemporaneamente una prova in bianco miscelando in un'altra provetta 1 ml di idrato sodico 1 N, 1 ml di acido solforico 2 N, 1 ml di monovanadato di ammonio.

La presenza di acido metatartarico è dimostrata dalla colorazione nettamente rossa della soluzione in esame, mentre la prova in bianco è di colore giallo.

6. Osservazioni

Nelle condizioni sperimentali descritte il limite di sensibilità è dell'ordine di 20 mg/l.

XXIII - BASI PIRIDICHE

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerca e determinazione delle "basi piridiche introdotte nel vino con l'aggiunta di alcol denaturato.

2. Principio del metodo

Le "basi piridiche" separate dal vino per distillazione sono identificate e determinate per spettrofotometria.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione al 20% (circa 5 N).*
3.2 *Acido solforico: soluzione 0,25 N.*
3.3 *Acido cloridrico: soluzione N.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Distillatore in vetro a giunti smerigliati.*
4.2 *Spettrofotometro registratore per UV.*

5. Procedimento

Nel pallone dell'apparecchio di distillazione neutralizzare 100 ml di vino con la soluzione di idrossido di sodio; alcalinizzare aggiungendo ancora 1 ml della stessa soluzione e sottoporre a distillazione raccogliendo 25 ml di distillato in una piccola beuta contenente 5 ml di soluzione di acido solforico 0,25 N, avendo cura di far pescare la punta del refrigerante nel liquido.

Porre il distillato nel pallone di un piccolo distillatore e concentrare, eliminando per distillazione 22-23 ml di liquido. Lasciare raffreddare, aggiungere nel pallone 0,5 ml di soluzione di idrossido di sodio e distillare lentamente fino a raccogliere 3 ml di distillato alcalino.

Acidificare con 0,5 ml di soluzione di acido cloridrico e sottoporre ad esame spettrofotometrico, determinando l'andamento dello spettro di assorbimento tra 200 e 300 nm in vaschetta da 1 cm contro acqua.

In presenza di basi piridiche provenienti dall'alcol denaturato si osserva un caratteristico picco di assorbimento con massimo attorno a 260 nm.

Calcolare il valore ΔK dalla formula:

$$\Delta K = K_{260} - \frac{K_{230} + K_{285}}{2}$$

in cui K sono le densità ottiche riscontrate alle diverse lunghezze d'onda.

Si considera dimostrata la presenza di basi piridiche provenienti dall'alcol denaturato per valori di ΔK uguali o superiori a 0,05. Dal valore di ΔK si può risalire al contenuto in alcol denaturato mediante opportuna curva di taratura costruita con soluzioni diluite di alcol denaturato o al contenuto in basi piridiche (espresse come picolina) con soluzioni diluite di picolina.

XXIV - AZOTO TOTALE

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'azoto totale nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

Mineralizzazione mediante acido solforico, distillazione dell'ammoniaca e titolazione per alcalimetria.

3. Reattivi

3.1 *Acido solforico (d = 1,84).*
3.2 *Acido benzoico.*
3.3 *Potassio solfato.*
3.4 *Mercurio.*
3.5 *Sodio ipofosfito.*
3.6 *Sodio idrossido: soluzione al 30%.*
3.7 *Acido cloridrico: soluzione 0,1 N.*

3.8 *Verde di bromocresolo: soluzione all'1%.*

Porre in un matraccio da 100 ml 1 g di bromocresolo, 14 ml di soluzione di idrossido di sodio 0,1 N, mescolare e portare a volume con acqua.

3.9 *Rosso metile: soluzione allo 0,2%.*

Sciogliere in un matraccio da 100 ml 0,2 g di rosso metile in 60 ml di alcol a 95° e portare a volume con acqua.

3.10 *Acido borico: soluzione al 4%.*

Sciogliere in un matraccio da 1 l 40 g di acido borico e portare a volume con acqua.

Questa soluzione, addizionata di cinque gocce di soluzione di rosso metile, deve diventare rosa mediante aggiunta di un massimo di 0,1 ml di soluzione di acido cloridrico 0,1 N. Quando l'acido borico di cui si dispone contiene una limitata quantità di basi come impurità si può ovviare all'inconveniente aggiungendo alla soluzione sei gocce di uno dei due indicatori (3.8-3.9) e provocarne il viraggio con poche gocce di acido cloridrico 0,1 N.

3.11 *Ammonio solfato: soluzione 0,1 N.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Apparecchio di mineralizzazione dotato di pallone di Kjeldhal da 300 ml.*

4.2 *Apparecchio di distillazione costituito da un pallone a fondo tondo da 1 l sormontato da una colonna di rettifica di 2,5 cm di diametro e di 30 cm di lunghezza collegata alla parte superiore di un refrigerante, tenuto in posizione verticale, di 1 cm di diametro interno e di 30 cm di lunghezza. La parte inferiore del refrigerante porta un tubo affilato che tocca il fondo della beuta di raccolta.*

5. Procedimento

Porre nel pallone di Kjeldhal, 25 ml del campione, 2 g di acido benzoico e 10 ml dell'acido solforico, una goccia di mercurio e 5 g di solfato di potassio. Scaldare il pallone fino a completa decolorazione e prolungare il riscaldamento per 30 min.

Raffreddare, travasare quantitativamente nel pallone di distillazione contenente 30 ml di acqua, lavando più volte con acqua. Lasciare raffreddare; aggiungere 0,5 g di ipofosfito di sodio e, dopo 15 min, una goccia della soluzione di fenolftaleina all'1%. Aggiungere una quantità della soluzione di idrossido di sodio sufficiente a dare una reazione alcalina (circa 40 ml), avendo cura di raffreddare sempre il pallone durante questa addizione. Distillare 200-250 ml raccogliendo il distillato in 30 ml della soluzione di acido borico.

Titolare l'ammoniaca distillata in presenza di verde di bromocresolo o di rosso metile con la soluzione di acido cloridrico 0,1 N.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di azoto per litro calcolati con la formula:

$$0{,}056 \cdot n$$

dove: n è il volume di acido cloridrico 0,1 N impiegato.

XXV - AZOTO AMMONIACALE

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'azoto ammoniacale nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

Il catione ammonio viene fissato su una resina cationica debole ed eluito con soluzione acida. Sul distillato dell'eluato, l'ammoniaca è titolata per alcalimetria.

3. Reattivi

3.1 *Scambiatore cationico: Amberlite IRC-50 (80-100 mesh) o equivalente.*

3.2 *Acido cloridrico: soluzione 1 N.*

3.3 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*

3.4 *Soluzione tampone neutra per lavaggio della resina.*

Sciogliere: Sodio fosfato (di) 15 g
Potassio fosfato (mono) 3,35 g

e portare al volume di 1 l con acqua.
Verificare che il *pH* sia 7 ± 0,2.

3.5 *Sodio idrossido: soluzione al 30%.*

3.6 *Acido cloridrico: soluzione 0,1 N.*

3.7 *Verde bromocresolo: soluzione all'1% (come in azoto totale 3.8).*

3.8 *Rosso metile: soluzione allo 0,2% (come in azoto totale 3.9).*

3.9 *Acido borico: soluzione 4% (come in azoto totale 3.10).*

4. Apparecchiatura

4.1 *Colonna cromatografica di vetro della lunghezza di 60 cm e diametro interno di 15 mm, munita di setto poroso e rubinetto.*

4.2 *Apparecchio di distillazione (come in azoto totale 4.2).*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione della colonna cromatografica.*

Introdurre nella colonna 25 g della resina. Lavare due volte alternativamente con una soluzione di idrossido di sodio 1 N e di acido cloridrico 1 N infine con acqua distillata fino a reazione negativa del cloro ione con nitrato di argento.

Far passare lentamente, attraverso la colonna, 50 ml della soluzione tampone e risciacquare con acqua distillata fino ad eliminare i fosfati (rivelabili con soluzione satura di acetato di piombo). Ripetere il trattamento con soluzione tampone ed il successivo lavaggio prima di ogni determinazione.

5.2 *Dosaggio dell'azoto ammoniacale.*

Porre in un bicchiere da 250 ml, 50 ml del campione ed un volume della soluzione di idrossido di sodio 1 N pari a (n – 0,5) ml, in cui n è il volume dell'idrossido di sodio 0,1 N utilizzato nella titolazione acidimetrica per 10 ml di campione.

Lasciare defluire il campione, così preparato, attraverso la colonna dello scambiatore in ragione di una goccia ogni 2 S; per una colonna ben preparata, il pH dell'effluente oscilla tra 4 e 5. Lavare la colonna con 50 ml di acqua distillata che deve defluire alla stessa velocità. Il catione ammonio, come gli altri cationi, viene fissato quantitativamente, mentre nelle acque di lavaggio passano le ammidi, gli oligopeptidi e quasi tutti gli amminoacidi. Eluire i cationi fissati dalla resina con 50 ml della soluzione di acido cloridrico 1 N e lavare con 50 ml di acqua distillata. Raccogliere eluato ed acque di lavaggio in un pallone di distillazione a fondo tondo da 1 l; aggiungere una goccia di fenolftaleina ed una quantità di idrossido di sodio al 30% sufficiente ad ottenere una reazione decisamente alcalina, avendo cura di raffreddare continuamente il pallone durante questa addizione.

Distillare circa metà del volume e raccogliere il distillato in 30 ml della soluzione di acido borico.

Titolare l'ammoniaca distillata, in presenza di verde di bromocresolo o di rosso metile, mediante una soluzione di acido cloridrico 0,1 N.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di azoto per litro calcolati con la formula:

$$0{,}028 \cdot n$$

dove: n = volume di acido cloridrico 0,1 N usato.

7. Osservazioni

Quando si opera con prodotti poveri di azoto ammoniacale, effettuare la determinazione su 100 ml ed usare per il calcolo l'espressione:

$$0{,}014 \cdot n.$$

XXVI - AZOTO AMMINICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'azoto amminico nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

La funzione amminica dell'amminoacido è bloccata per aggiunta di aldeide formica ed il carbossile, reso libero, è dosato per acidimetria.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*
3.2 *Bario cloruro: soluzione 1 N.*
3.3 *Sodio idrossido: soluzione 0,1 N.*
3.4 *Acido cloidrico: (d = 1,19).*
3.5 *Aldeide formica: soluzione al 40% (d = 1,09).*

4. Apparecchiatura

4.1 *pHmetro sensibile a variazioni di 0,05 pH.*

5. Procedimento

Porre in un bicchiere da 200 ml, 100 ml del campione, portare a pH 8, controllando col pHmetro, con la soluzione di idrossido di sodio 1 N e aggiungere 10 ml della soluzione di cloruro di bario. Attendere 15 min, trasferire in matraccio da 200 ml, portare a volume con acqua, agitare e filtrare. Prelevare 100 ml di liquido e riportare, se necessario, a pH 8. Aggiungere 25 ml di aldeide formica, preventivamente portati a pH 8, e titolare con la soluzione di idrossido di sodio 0,1 N fino a pH 8.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di azoto per litro calcolati con la formula:

$$0{,}028\ n - A$$

dove:

n = ml di idrossido di sodio 0,1 N impiegati;
A = azoto ammoniacale espresso in grammi di azoto per litro.

7. Osservazioni

Per calcolare l'azoto amminico è necessario conoscere anche l'azoto ammoniacale in quanto nella titolazione con idrossido di sodio si neutralizzano i carbossili degli amminoacidi e quelli degli acidi dei sali di ammonio liberati dall'aldeide formica.

XXVII - PROLINA

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione della prolina nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

La prolina reagisce con la ninidrina in presenza di acido formico per formare un derivato colorato in rosso che viene dosato colorimetricamente.

3. Reattivi

3.1 *Glicole etilenico monometiletere (metilcellosolve) esente da perossidi.*

3.2 *Acido formico.*

3.3 *Ninidrina: soluzione al 3% in metilcellosolve preparata al momento dell'uso.*

3.4 *Isopropanolo: soluzione diluita con acqua 1+1.*

3.5 *Prolina.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofotometro o fotocolorimetro.*

5. Procedimento

5.1 *Dosaggio della prolina.*

Porre in un tubo da saggio a tappo smerigliato 0,5 ml del campione eventualmente diluito in modo da contenere una quantità di prolina non superiore a 50 mg/l.

Aggiungere 0,25 ml di acido formico e 1 ml della soluzione di ninidrina.

Porre il tubo tappato in bagno-maria bollente per 15 min. Raffreddare il tubo in bagno d'acqua a 20°C e durante il raffreddamento aggiungere 5 ml della soluzione di isopropanolo. Mescolare e leggere la DO a 517 nm, dopo il raffreddamento del campione, almeno 5 minuti dopo ed entro 30 min dall'estrazione del tubo dal bagno di riscaldamento. La lettura viene fatta in confronto ad una prova in bianco preparata sostituendo 0,5 ml di acqua al prodotto in esame.

5.2 *Preparazione della curva di taratura.*

Sciogliere 0,500 g di prolina in acqua e portare al volume di 500 ml in matraccio. Mediante microburetta prelevare e porre in 5 matracci da 100 ml 1, 2, 3, 4, 5 ml di questa soluzione e portare a volume. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 10, 20, 30, 40, 50 mg/l di prolina. Procedere come descritto in 5.1 e costruire la curva di taratura riportando in grafico i valori delle DO in funzione delle concentrazioni delle soluzioni di riferimento.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di prolina per litro.

XXVIII - TIAMINA

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione della tiamina nei prodotti destinati all'acetificazione e nell'aceto.

2. Principio del metodo

La tiamina viene estratta con isobutanolo, ossidata a tiocromo con ferricianuro di potassio e determinata fluorimetricamente.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione al 15%.*

3.2 *Metanolo.*

3.3 *Isobutanolo purificato: agitare l'isobutanolo con alcuni ml di idrossido di sodio al 15%, lavare poi con acqua e seccare su solfato di sodio anidro.*

3.4 *Potassio ferricianuro: soluzione al 2% preparata di recente.*

3.5 *Tiamina cloridrato.*

3.6 *Sodio solfato anidro.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Fluorimetro o spettrofotometro con accessorio per fluorimetria:*
lunghezza d'onda di eccitazione 365 nm
lunghezza d'onda della fluorescenza 435 nm.

5. Procedimento

5.1 *Dosaggio della tiamina.*

Diluire con acqua il prodotto da esaminare in modo da portare la concentrazione in tiamina nell'intervallo di concentrazioni coperto dalla curva di taratura (5 o 10 diluizioni per i prodotti aggiunti della quantità prescritta di 5 g quintale di tiamina).

in un imbuto separatore porre:
1 ml del prodotto diluito
0,5 ml della soluzione di idrossido di sodio
1 ml di metanolo
10 ml di isobutanolo.

Agitare per due min; lasciare decantare ed eliminare la fase acquosa.

Aggiungere 0,5 ml della soluzione di idrossido di sodio e 4 gocce della soluzione di ferricianuro di potassio. Agitare per 1 min, lasciare decantare ed eliminare la fase acquosa, seccare la fase butanolica con sodio solfato anidro.

Procedere alla misura della fluorescenza a 435 nm con luce di eccitazione a 365 nm contro un bianco ottenuto sullo stesso campione diluito, aggiunto di tutti i reattivi tranne il ferricianuro. Ricavare il contenuto in tiamina dalla curva di taratura.

5.2 *Preparazione della curva di taratura.*

Sciogliere in acqua 0,1 g di tiamina cloridrato e portare al volume di 100 ml in matraccio

Trasferire 5 ml di detta soluzione in matraccio da 1000 ml e portare a volume con acqua. In una serie di matracci da 100 ml porre rispettivamente 1, 2, 4, 6, 8, 10 ml dell'ultima soluzione e portare a volume con acqua.

Queste soluzioni contengono 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/l di tiamina cloridrato.

Su 1 ml di ciascuna soluzione, in una serie di imbuti separatori, si procede come in 5.1 eseguendo parallelamente lo stesso procedimento su 1 ml di acqua (prova in bianco).

Con i valori misurati della fluorescenza si costruisce la curva di taratura.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di tiamina cloridrato per litro o in g/quintale.

XXIX - POTASSIO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del potassio nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

È basato sull'impiego della fotometria di fiamma in emissione.

3. Reattivi

3.1 *Potassio cloruro.*

3.2 *Acido cloridrico (d — 1,186).*

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofotometro o fotometro a fiamma.*

5. Procedimento

5.1 *Dosaggio del potassio.*

Diluire il campione con acqua fino a far rientrare la concentrazione in potassio nel campo delle soluzioni standard. Leggere le T % del campione alle lunghezze d'onda di 740 nm (Tb); 768 nm (T max); 790 nm (Ta). La T % del campione è data dall'espressione riportata in 5.2.

5.2 *Preparazione della curva di taratura.*

Pesare g 1,9068 di cloruro di potassio, disseccato a 100°C fino a peso costante, e trasferirli in un matraccio da 1000 ml. Aggiungere 50 ml di acqua, agitare fino a completa solubilizzazione, aggiungere 10 ml di acido cloridrico e portare a volume con acqua. Questa soluzione contiene 1 mg/ml di potassio (soluzione A).

Mediante microburetta preparare dalla soluzione A, gli standard acquosi contenenti rispettivamente 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/l di potassio.

Leggere le T % alle tre lunghezze d'onda indicate in 5.1 e costruire la curva di taratura riportando in diagramma i mg/l di potassio di ciascuno standard in funzione della corrispondente T % ottenuta dall'espressione

$$T\,\% = T_{max} - \frac{T_a + T_b}{2}$$

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di potassio per litro.

7. Osservazioni

La curva di taratura va controllata frequentemente con gli standard. Qualora vi fosse una deviazione dalla curva di taratura iniziale, calcolare il fattore di correzione che è dato dal rapporto, per lo standard considerato, tra la T% della curva di taratura iniziale e quella di controllo. Moltiplicando la lettura effettuata sul campione per tale fattore, si otterrà la lettura corretta riferibile alla curva di taratura.

XXX - LITIO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del litio nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

È basato sull'impiego della fotometria di fiamma in emissione.

3. Reattivi

3.1 *Litio cloruro.*

3.2 *Acido cloridrico (d = 1,186).*

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofotometro o fotometro a fiamma.*

5. Procedimento

5.1 *Dosaggio del litio.*

5.1.1 *Dosaggio del litio aggiunto come rivelatore.*

Diluire il campione con acqua sino a fare rientrare la concentrazione in litio nel campo delle soluzioni standard. Leggere la T% alla lunghezza d'onda di 670,78 nm e calcolare la concentrazione in litio per mezzo della curva di taratura (5.2.1).

5.1.2 *Dosaggio del litio naturale.*

Leggere la T% a 670,78 nm sul campione tal quale e calcolare la concentrazione in litio per mezzo della curva di taratura (5.2.2).

5.2 *Preparazione della curva di taratura.*

5.2.1 *Per la determinazione del contenuto in cloruro di litio aggiunto come rivelatore.*

Pesare g 6,109 di cloruro di litio e trasferirli in un matraccio da 1000 ml. Aggiungere 50 ml di acqua, agitare fino a completa solubilizzazione, aggiungere 10 ml di acido cloridrico e portare a volume con acqua. Questa soluzione contiene 1 mg/ml di litio (soluzione A).

Mediante microburetta preparare dalla soluzione A, gli standard acquosi contenenti rispettivamente 0,2 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 mg/l di litio.

Con i valori delle T% di tali soluzioni, misurate a 670,78 nm, costruire la curva di taratura.

5.2.2 *Per la determinazione del contenuto naturale in litio.*

Diluire venti volte gli standard acquosi utilizzati per la curva di taratura 5.2.1. Le soluzioni ottenute contengono rispettivamente 10 - 25 - 50 - 75 - 100 microgrammi di litio per litro. Con i valori di T% di queste soluzioni costruire la curva di taratura.

6. Espressione del risultato

Il contenuto naturale si esprime in microgrammi di litio per litro.

Il contenuto in litio aggiunto come rivelatore si esprime in mg di cloruro di litio per litro.

XXXI - CALCIO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del calcio nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

Dopo incenerimento del prodotto il calcio viene determinato per complessometria o mediante spettrofotometria di assorbimento atomico.

A METODO COMPLESSOMETRICO

3. Reattivi

3.1 *Acido cloridrico: soluzione 0,2 N.*

3.2 *Etilendiamminotetracetato disodico biidrato: soluzione contenente 18,61 g/L*

3.3 *Sodio idrossido: soluzione al 40%.*

3.4 *Indicatore all'acido calconcarbonico: miscela di 1 g di acido calcon-carbonico o acido 2-idrossi-4-sulfo-1-naftilazo-3-naftoico con 100 g di solfato di sodio anidro.*

3.5 *Calcio cloruro: soluzione 0,05 M.*

Sciogliere 5,05 g di carbonato di calcio nella quantità necessaria di acido cloridrico diluito e portare al volume di un litro. Titolare questa soluzione con la soluzione di EDTA disodico in presenza dell'indicatore come in 4.2 (dosaggio del calcio).

4. Procedimento

4.1 *Preparazione del campione.*

Evaporare a secco su bagnomaria bollente 50 ml di prodotto in una capsula di platino e incenerire il residuo.

Sciogliere le ceneri in 10 ml di acido cloridrico 0,2 N e travasare in un matraccio da 50 ml lavando ripetutamente la capsula e portando le acque di lavaggio nel matraccio stesso. Portare a volume ed agitare.

4.2 *Dosaggio del calcio.*

Portare all'ebollizione 20 ml della soluzione delle ceneri, lasciar raffreddare e aggiungere:

0,5 ml della soluzione di idrossido di sodio
10 ml della soluzione di EDTA disodico
100 mg circa di indicatore.

Titolare l'eccesso di EDTA con la soluzione di cloruro di calcio. L'indicatore vira dal blu-violetto al rosso vinoso.

Sia n il numero di ml necessari per raggiungere il viraggio.

5. Espressione del risultato

Si esprime in mg di calcio per litro calcolati con la formula

$$(10-n) \cdot 100$$

B METODO PER SPETTROFOTOMETRIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO

3. Reattivi

3.1 *Acido cloridrico (p.s. 1,186).*

3.2 *Acido cloridrico: soluzione 0,2 N.*

3.3 *Ossalato ammonico: soluzione satura.*

3.4 *Idrossido di ammonio.*

3.5 *Calcio carbonato.*

3.6 *Acqua ossigenata 36%.*

4. Apparecchiatura

Spettrofotometro di assorbimento atomico.

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

Evaporare a secco su bagnomaria bollente 50 ml di prodotto in una capsula di platino e incenerire il residuo.

Sciogliere le ceneri in 10 ml della soluzione di acido cloridrico e travasare in un bicchiere da 100 ml unendo le acque di lavaggio della capsula.

Portare all'ebollizione, aggiungere 10 ml della soluzione di ossalato am-

monico e portare a pH 4,5 circa con ammoniaca usando rosso di metile come indicatore (viraggio all'aranciato).

Lasciar raffreddare e dopo due ore filtrare su crogiolo a setto poroso (G 4) e lavare con acqua.

Sciogliere il precipitato sul crogiolo con 10 ml della soluzione di acido cloridrico raccogliendo il liquido in un bicchiere da 100 ml e lavare con 30 ml di acqua il crogiolo. Aggiungere 0,5 ml di acqua ossigenata e riscaldare su piccola fiamma fino a che cessa lo svolgimento di bollicine, allo scopo di distruggere l'acido ossalico.

Lasciare raffreddare e trasferire il liquido in matraccio da 50 ml portando a volume con acqua.

5.2 *Dosaggio del calcio.*

Diluire la soluzione così ottenuta fino a far rientrare la concentrazione in calcio nel campo delle concentrazioni delle soluzioni standard (in genere 50 diluizioni).

Leggere l'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda di 422,67 nm e calcolarne la concentrazione in calcio per mezzo della curva di taratura.

5.3 *Preparazione della curva di taratura.*

Pesare 0,498 g di carbonato di calcio e trasferirli quantitativamente in un matraccio da 1000 ml. Aggiungere 50 ml di acqua e 10 ml di acido cloridrico.

Attendere la completa solubilizzazione, introdurre ancora 10 ml di acido cloridrico e portare a volume con acqua. Questa soluzione contiene 1000 mg/l di calcio.

Prelevare 10 ml della soluzione e trasferirli in un matraccio da 100 ml portando a volume con acqua; questa soluzione contiene 100 mg/l di calcio.

Mediante microburetta prelevare 1 - 2 - 3 - 4 - 5 ml dell'ultima soluzione e trasferirli in matracci da 100 ml portando a volume con acqua. Si ottengono così le soluzioni standard contenenti rispettivamente 1 - 2 - 3 - 4 - 5 mg/l di calcio.

Con i valori delle assorbanze di tali soluzioni, misurate come descritto in B) 5.2, si costruisce la curva di taratura.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di calcio per litro.

XXXII - MAGNESIO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del magnesio nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

È basato sull'impiego della spettrofotometria di assorbimento atomico.

3. Reattivi

3.1 *Magnesio metallo.*

3.2 *Acido cloridrico concentrato (d = 1,186).*

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofotometro di assorbimento atomico.*

5. Procedimento

5.1 *Dosaggio del magnesio.*

Diluire il campione con acqua sino a far rientrare la concentrazione in magnesio nel campo delle soluzioni standard. Leggere l'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda di 285,21 nm e calcolarne la concentrazione in magnesio per mezzo della curva di taratura.

5.2 *Preparazione della curva di taratura.*

Pesare 1 g di Magnesio metallico, trasferirlo quantitativamente in un matraccio da 1000 ml. Sciogliere il metallo con la minima quantità necessaria in acido cloridrico diluito (1+1); attendere la completa solubilizzazione, aggiungere 10 ml di acido cloridrico concentrato e portare a volume con acqua.

Questa soluzione contiene 1000 mg/l di magnesio.

Mediante pipetta tarata, prelevare 10 ml della soluzione suddetta e trasferirli in un matraccio da 100 ml portando a volume con acqua: questa soluzione contiene 100 mg/l di Magnesio.

Mediante microburetta prelevare 0,5 - 1 - 1,5 - 2 ml dell'ultima soluzione, trasferirli in matraccio da 100 ml portando a volume con acqua: si ottengono così le soluzioni standard contenenti rispettivamente 0,5 - 1 - 1,5 - 2 mg/l di

magnesio. Con i valori delle assorbanze di tali soluzioni, misurate come descritto in 5.1, si costruisce la curva di taratura.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di magnesio per litro.

XXXIII - ZINCO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dello zinco nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

È basato sull'impiego della spettrofotometria di assorbimento atomico.

3. Reattivi

3.1 *Zinco metallo.*

3.2 *Acido cloridrico (p.s. 1,18).*

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofotometro di assorbimento atomico.*

5. Procedimento

5.1 *Dosaggio dello zinco.*

Diluire, se necessario, il campione con acqua fino a far rientrare la concentrazione in zinco nel campo delle soluzioni standard. Leggere l'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda di 213,8 nm e calcolarne la concentrazione in zinco per mezzo della curva di taratura.

5.2 *Preparazione della curva di taratura.*

Pesare 1 g di zinco metallico, trasferirlo quantitativamente in un matraccio da 1000 ml. Aggiungere la minima quantità necessaria di acido cloridrico diluito (1+1) per sciogliere il metallo; attendere la completa solubilizzazione e aggiungere 10 ml di acido cloridrico concentrato, portando a volume con acqua. Questa soluzione contiene 1000 mg/l di zinco. Prelevare 10 ml della soluzione suddetta e trasferirli in un matraccio da 100 ml portando a volume con acqua. Questa soluzione contiene 100 mg/l di zinco.

Mediante microburetta prelevare 1-2-3-4-5 ml dell'ultima soluzione, trasferirli in matracci da 100 ml portando a volume con acqua; si ottengono così le soluzioni standard contenenti rispettivamente 1-2-3-4-5 mg/l di zinco con i valori delle assorbanze di tali soluzioni, misurate come descritto in 5.1, si costruisce la curva di taratura.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di zinco per litro.

XXXIV - PIOMBO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del piombo nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

È basato sull'impiego della spettrofotometria di assorbimento atomico.

3. Reattivi

3.1 *Piombo nitrato.*
3.2 *Acido nitrico (p.s. 1,413).*
3.3 *Acido solforico (p.s. 1,835).*

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofotometro di assorbimento atomico.*
4.2 *Capsula di platino del diametro di 9 cm e 4 cm di altezza.*

5. Procedimento

5.1 *Dosaggio del piombo.*

Trasferire con pipetta tarata 100 ml del campione nella capsula di platino, evaporare su bagno-maria fino a consistenza sciropposa, aggiungere goccia a goccia 2,5 ml di acido solforico concentrato cercando di coprire tutto il fondo della capsula.

Procedere cautamente alla carbonizzazione del residuo su piastra riscaldante elettrica oppure su piccola fiamma; introdurre quindi la capsula nel forno a muffola regolato alla temperatura di 500°C, lasciandola per circa 1 h. Dopo raffreddamento umettare le ceneri con 1 ml di acido nitrico concentrato, spappolandole con una bacchettina di vetro; evaporare e carbonizzare nuovamente con le stesse modalità. Portare nuovamente la capsula in muffola per 15 min; ripetere almeno tre volte il trattamento con acido nitrico concentrato. Solubilizzare le ceneri aggiungendo nella capsula 1 ml di acido nitrico concentrato e 2 ml di acqua; trasferirle in un matraccio da 10 ml, lavare tre volte la capsula con 2 ml di acqua, trasferendola nel matraccio, portare infine a volume con acqua.

Leggere l'assorbanza della soluzione alle lunghezze d'onda di 283,3 nm e di 280,2 nm. La differenza fra le due letture dà il valore dell'assorbanza che serve per risalire alla concentrazione in piombo per mezzo della curva di taratura.

5.2 *Preparazione della curva di taratura.*

Pesare 1,589 g di nitrato di piombo, trasferirli quantitativamente in un matraccio da 1000 ml. Aggiungere 20 ml di acqua, attendere la completa solubilizzazione e aggiungere 10 ml di acido nitrico, portando a volume con acqua.

Questa soluzione contiene 1000 mg/l di piombo.

Prelevare 10 ml della soluzione suddetta e trasferirli in matraccio da 100 ml portando a volume con acqua; questa soluzione contiene 100 mg/l di piombo.

Mediante microburetta prelevare 1-2-3-4-5 ml dell'ultima soluzione, trasferirli in matracci da 100 ml portando a volume con acqua; si ottengono così le soluzioni standard contenenti rispettivamente 1-2-3-4-5 mg/l di piombo. Con i valori delle assorbanze di tali soluzioni, misurate a 283,3 nm, costruire la curva di taratura.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di piombo per litro.

7. Osservazioni

Per ottenere un risultato esente da interferenze dovute alla forte concentrazione di sali presenti nella soluzione (light scattering) è necessario sottrarre l'assorbanza letta su una riga di non assorbimento del piombo (280,2 nm) da quella letta a 283,3 nm.

XXXV - SOSTANZE FENOLICHE TOTALI

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione delle sostanze fenoliche totali nel mosto e nel vino.

A METODO AL REATTIVO DI FOLIN-CIOCALTEU

2. Principio del metodo

Si basa sulla riduzione del reattivo di Folin-Ciocalteu in ambiente alcalino, con formazione di una colorazione azzurra.

3. Reattivi

3.1 *Reattivo di Folin-Ciocalteu: disponibile in commercio.*
3.2 *Sodio carbonato anidro: soluzione al 20%.*

4. Apparecchiatura

Spettrofotometro o fotocolorimetro.

5. Procedimento

Porre in un matraccio da 100 ml 1 ml di prodotto (diluito 10 volte se rosso), 50 ml di acqua, 5 ml di reattivo, 10 ml della soluzione di carbonato sodico e portare a volume con acqua.

Lasciare due ore a temperatura ambiente e misurare la densità ottica a 760 nm in vaschetta da 10 mm di percorso ottico in confronto all'acqua.

6. Espressione del risultato

Si esprime come Indice di Polifenoli calcolato con la formula:

$$DO \cdot n \cdot 20$$

dove:

DO — valore della densità ottica misurata
n — diluizioni effettuate sul campione.

B METODO PER SPETTROFOTOMETRIA NELL'ULTRAVIOLETTO

2. Principio del metodo

Si basa sulla misura spettrofotometrica della DO a 280 nm.

3. Apparecchiatura

3.1 *Spettrofotometro.*

4. Procedimento

Diluire opportunamente il campione e misurare la DO a 280 nm in vaschetta di 10 mm di percorso ottico, in confronto all'acqua.

5. Espressione del risultato

Si esprime in DO_{280} calcolata con la formula:

$$DO \cdot n$$

dove:

DO — valore della densità ottica misurata
n — diluizioni effettuate sul campione.

XXXVI - DIGLUCOSIDE MALVOSIDICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del diglucoside malvosidico nel vino rosso e rosato.

2. Principio del metodo

Si misura la fluorescenza del prodotto di ossidazione del diglucoside malvosidico.

Poiché l'anidride solforosa libera attenua la fluorescenza la si deve preventivamente combinare con un eccesso di acetaldeide.

3. Reattivi

3.1 *Acetaldeide: soluzione al 10% in etanolo al 96%.*

3.2 *Acido cloridrico: soluzione 1 N.*

3.3 *Sodio nitrito: soluzione all'1%.*

3.4 *Etanolo al 96% contenente il 5% di idrossido di ammonio.*

3.5 *Chinina solfato: sciogliere 10 mg di solfato di chinina in 100 ml di acido solforico 0,1 N.*
Portare 20 ml di questa soluzione ad 1 litro con acido solforico 0,1 N.

4. Apparecchiatura

4.1 *Apparecchio per misure di fluorescenza: lunghezza d'onda di eccitazione 365 nm, lunghezza d'onda della fluorescenza 490 nm.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

Porre in un tubo da saggio 10 ml di vino e 1,5 ml della soluzione di acetaldeide. Attendere 20 min.

5.2 *Dosaggio del glucoside malvosidico.*

Porre in un tubo da centrifuga 1 ml del campione trattato come in 5.1; 0,05 ml dell'acido cloridrico e 1 ml della soluzione di nitrito di sodio. Mescolare, attendere 2 min e aggiungere 10 ml dell'etanolo ammoniacale. Agitare, attendere 10 min e centrifugare. Sul liquido limpido sumatante eseguire la misura della fluorescenza in vaschette da 10 mm. L'apparecchio deve essere previamente tarato in modo che l'intensità della fluorescenza della soluzione di solfato di chinina, in vaschetta da 10 mm, dia il 100% di trasmissione.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di diglucoside malvosidico per litro calcolati con la formula:

$$(T - 6) \cdot 0{,}426 \cdot \frac{11{,}5}{10} = (T - 6) \cdot 0{,}49$$

dove:

T = trasmissione ottica %

6 = trasmissione ottica % di un vino esente da diglucoside malvosidico

0,426 = mg/l di diglucoside malvosidico cui corrisponde il valore 1 di trasmissione.

XXXVII - CARATTERISTICHE CROMATICHE

1. Scopo e campo di applicazione

Definire in termini numerici due caratteristiche cromatiche convenzionali (intensità e nuance) del vino e dell'aceto rossi e rosati.

2. Principio del metodo

Misura delle DO alle lunghezze d'onda di 420 e 520 nm e calcolo dei valori dell'intensità e della nuance.

3. Apparecchiatura

3.1 *Spettrofotometro e fotocolorimetro.*

4. Procedimento

Si misurano le DO del prodotto non diluito, alle lunghezze d'onda di 420 e 520 nm, in confronto all'acqua, utilizzando vaschette di spessore adeguato all'intensità colorante del prodotto e riportando il valore allo spessore di 10 mm.

5. Espressione del risultato

5.1 *Intensità.*

Per definizione l'intensità è data dalla somma delle due assorbanze

$$DO_{420} + DO_{520}$$

sotto lo spessore di 10 mm.

5.2 *Nuance.*

La "nuance" è espressa dall'angolo che la retta congiungente i punti della curva spettrofotometrica corrispondenti alle DO_{420} e DO_{520} forma con la direzione positiva dell'asse delle ascisse.

La tangente di questo angolo è uguale alla differenza $DO_{520} - DO_{420}$; si ricava questo angolo dalle tavole trigonometriche degli angoli espressi in gradi sessagesimali.

Le scale convenzionali con le quali si deve registrare la curva delle assorbanze per poter misurare questo angolo in modo normalizzato sono le seguenti:

- ascisse: 1 cm = 10 nm
- ordinate: 1 cm = 0,1 di assorbanza del prodotto sotto lo spessore di 10 mm.

In tal modo la nuance di colore dei vini rossi viene espressa come segue:

angoli da 0 a 51°	colore rosso
angoli da 52 a 80°	colore rosso porpora
angoli negativi	colore rosso mattone dei vini vecchi.

XXXVIII - MATERIE COLORANTI ESTRANEE

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerche dei coloranti organici rossi di sintesi, di natura acida, nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Princípio del metodo

I coloranti di natura acida vengono fissati su lana in ambiente acido, eluiti in ambiente alcalino e identificati per cromatografia su strato sottile.

A SAGGIO PRELIMINARE (Metodo Arata)

3. Reattivi

3.1 *Potassio solfato acido: soluzione al 10%.*
3.2 *Acido cloridrico (d = 1,10).*
3.3 *Ammonio idrato (d = 0,880).*
3.4 *Lana bianca, sgrassata con etere etilico e lavata con soluzione diluita di idrossido di sodio e acqua.*

4. Procedimento

Far bollire 100 ml di prodotto in un bicchiere da 250 ml, fino a ridurre di circa un terzo il volume del liquido. Aggiungere 5-10 ml della soluzione di solfato acido di potassio, 0,5 g di lana e far bollire per almeno 5 min. Decantare il liquido e lavare ripetutamente la lana con acqua. Aggiungere 50-100 ml di acqua acidulata con l'acido cloridrico; bollire per 5 min., decantare il liquido e ripetere il lavaggio fino ad ottenere acqua incolore, dopo l'ebollizione. Lavare ripetutamente la lana fino a scomparsa della reazione acida. Versare nel bicchiere 50 ml di acqua e 1 ml di idrossido di ammonio; far bollire per almeno 10 min. Decantare il liquido raccogliendolo in un bicchiere ed eliminare per ebollizione l'eccesso di ammoniaca. Raffreddare ed aggiungere acido cloridrico fino a reazione nettamente acida. Introdurre nel liquido un filo di lana bianca e far bollire per circa 5 min. Lavare la lana accuratamente con acqua. Una netta colorazione rossa indica la presenza di materie coloranti estranee.

5. Osservazioni

Se la colorazione della lana è debole, ripetere il procedimento a partire dall'aggiunta della soluzione di idrossido di ammonio. Se la lana risultasse ancora colorata in rosso, anche se debolmente, sono presenti materie coloranti estranee. La colorazione della lana nella soluzione alcalina, non deve mai volgere al verde. Alcuni prodotti genuini, intensamente colorati, possono dare delle colorazioni dal giallo al bruno.

B IDENTIFICAZIONE DEI COLORANTI PER CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE

3. Reattivi

3.1 *Lastre di gel di silice G.*
3.2 *Liquido di sviluppo: butanolo, acqua, etanolo, idrato di ammonio (50+25+25+10) v/v.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Attrezzatura per la cromatografia su strato sottile.*

5. Procedimento

Introdurre la lana colorata in rosso, ottenuta come in A 5. in un bicchiere da 25 ml contenente 5 ml di acqua distillata resa alcalina con qualche goccia di idrato di ammonio; concentrare il liquido su bagnomaria bollente fino a metà volume e decantare il liquido raccogliendolo in una provetta. Depositare sulla lastra, alla distanza di 2 cm dal bordo inferiore, in punti distanziati di 2,5 cm, 40 μl della soluzione del campione in esame e delle soluzioni dei coloranti di cui si presuppone la presenza. Introdurre la lastra nella camera cromatografica che deve essere già satura dei vapori del liquido di sviluppo. Lasciare migrare il liquido di sviluppo fino a circa 15 cm dalla linea di deposizione; estrarre la lastra e far asciugare all'aria.

L'identificazione della materia colorante estranea viene effettuata per confronto con gli *Rf* dei coloranti noti depositati sulla lastra.

XXXIX - CARAMELLO

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerca del caramello nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

I polimeri colorati che si formano nella caramellizzazione degli zuccheri vengono separati per gelfiltrazione e rivelati allo spettrofotometro.

3. Reattivi

3.1 *Sephadex (G 25 Coarse).*

3.2 *Caramello: soluzione allo 0,5‰ circa del prodotto commerciale E 150.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Colonna cromatografica della lunghezza di 70 cm e del diametro di 16 mm (tipo K 16/70 della Pharmacia o equivalente).*

4.2 *Spettrofotometro o fotocolorimetro.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione della colonna cromatografica.*

Lasciare rigonfiare 35 g di Sephadex per almeno 3 h in un bicchiere contenente 250 ml di acqua. Con il gel così preparato riempire la colonna cromatografica e quando il prodotto si è assestato chiudere la colonna stessa e collegarla, direttamente o mediante una pompa peristaltica, ad un serbatoio della capacità di 500 ml.

5.2 *Taratura della colonna.*

Introdurre in colonna 5 ml della soluzione di caramello ed eluire poi con acqua alla velocità di 4 gocce al min.

Scartare i primi 45 ml di eluato dal momento dell'introduzione della soluzione di caramello.

Raccogliere 15 frazioni di 5 ml di eluato ciascuna e misurare le DO delle singole frazioni alla lunghezza d'onda di 400 nm in vaschette da 1 cm di spessore.

Riportare le DO in funzione dei numeri successivi delle frazioni.

Nelle condizioni descritte il caramello passa tra la seconda e l'ottava frazione con un massimo della DO nella frazione n. 3.

L'operazione di taratura della colonna servirà comunque a stabilire, caso per caso, in quali frazioni si ha il passaggio del caramello e il massimo della DO.

5.3 *Ricerca del caramello.*

Dopo aver lavato la colonna facendo percolare almeno 500 ml di acqua, introdurvi 5 ml del prodotto in esame e procedere all'eluizione e alla lettura spettrofotometrica delle frazioni come indicato in 5.2.

La presenza di caramello è evidenziata da un massimo della DO in corrispondenza della stessa frazione che ha mostrato il massimo nella taratura della colonna (frazione n. 3).

6. Osservazioni

Per evitare il deterioramento della colonna per contaminazione da muffe, durante il periodo di non utilizzo è necessario imbibirla con una soluzione di sodio azide allo 0,2‰, che sarà allontanata mediante lavaggi con acqua prima del reimpiego.

XL - EDULCORANTI SINTETICI

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerca della saccarina, della dulcina, del ciclamato e del P-4000 nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

La saccarina, la dulcina e il P-4000 vengono estratti in ambiente acido, con benzene; il ciclamato viene estratto dal vino, dopo questa estrazione benzenica, con acetato di etile. I residui dell'evaporazione dei solventi vengono sottoposti a cromatografia su strato sottile.

3. Reattivi

3.1 *Benzene.*
3.2 *Etile acetato.*
3.3 *Acetone.*
3.4 *Ammonio idrossido (d = 0,880).*
3.5 *Cloroformio.*
3.6 *Toluene.*
3.7 *Metanolo.*
3.8 *Acido acetico glaciale.*
3.9 *Acido cloridrico: diluito 1+2.*
3.10 *Acido nitrico: soluzione al 25% (v/v).*
3.11 *Cellulosa per cromatografia.*
3.12 *Poliamide per cromatografia.*
3.13 *Cloroformio + metanolo:* miscela (2+3) v/v.
3.14 *Liquido di sviluppo per la saccarina ed il ciclamato: acetone, acetato di etile, idrato di ammonio (60+30+10).*
3.15 *Liquido di sviluppo per la dulcina e il P-4000: toluene, metanolo, acido acetico (90+10+10).*
3.16 *Benzidina: soluzione allo 0,25% in metanolo.*
3.17 *Rame acetato (ico):* soluzione satura.
3.18 *Anilina* distillata di fresco.
3.19 *Rivelatore per la saccarina ed il ciclamato.*

Mescolare al momento dell'uso 15 ml della soluzione di benzidina, 1 ml di anilina e 0,75 ml della soluzione di acetato di rame.

3.20 *1-4-Paradimetilamminobenzaldeide: soluzione al 2% in metanolo.*
3.21 *Rivelatore per la dulcina e il P-4000.*

Porre, al momento dell'uso, in un matraccio da 100 ml, 50 ml della soluzione di 1-4-Paradimetilamminobenzaldeide, 10 ml della soluzione di acido nitrico e portare a volume con metanolo.

3.22 *Etanolo a 96°.*
3.23 *Etanolo a 50°.*
3.24 *Ciclamato: soluzione idroalcolica allo 0,1%.*

Sciogliere 100 mg di sale di sodio o di sale di calcio dell'acido cicloesilsulfammico in 100 ml dell'etanolo a 50°.

3.25 *Saccarina (sulfimmide benzoica): soluzione allo 0,05%.*
3.26 *Dulcina (P-etossifenilurea): soluzione allo 0,05% in metanolo.*
3.27 *P-4000 (2-N-propossi-2-ammino-4-nitrobenzene): soluzione allo 0,05% in metanolo.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Attrezzatura per la cromatografia su strato sottile.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione delle lastre di cellulosa.*

Sospendere 65 g di cellulosa in 180 ml di acqua. Omogeneizzare accuratamente con agitatore meccanico. Distendere la sospensione in spessore di 0,40 mm. La dose è sufficiente per preparare 8-9 lastre (20x20 cm). Lasciare asciugare all'aria per almeno 10-12 ore.

5.2 *Preparazione delle lastre di poliamide.*

Sospendere 10 g di poliamide in 90 ml della miscela di metanolo-cloroformio. Distendere la sospensione in spessore di 0,3 mm. La dose è sufficiente per preparare 7 lastre. Lasciare asciugare per 10 min all'aria e poi in stufa a 60-70°C per 15 min.

5.3 *Estrazione degli edulcoranti sintetici.*

Evaporare per ebollizione 100 ml di prodotto posti in un bicchiere da 250 ml fino a ridurre il volume a 30 ml, favorendo l'operazione con un getto di aria sulla superficie del liquido. Raffreddare; acidificare con 3 ml dell'acido

cloridrico. Travasare in beuta da 500 ml con tappo smerigliato; aggiungere 40 ml di benzene e agitare con agitatore meccanico per 30 min.

Travasare in un imbuto separatore e lasciar separare la fase organica e centrifugare in caso di emulsione. Porre la fase organica in una beuta da 150 ml con tappo smerigliato. Versare il residuo dell'estrazione con benzene, in una beuta da 500 ml con tappo smerigliato e aggiungere 40 ml di acetato di etile. Agitare per 30 min, con agitatore meccanico. Travasare in imbuto separatore e separare la fase organica, versandola in altra beuta da 150 ml. Evaporare separatamente i due estratti in capsula di porcellana di 50-60 mm di diametro su bagnomaria, favorendo l'operazione con un getto di aria. Dopo aver evaporato a consistenza sciropposa l'estratto benzenico, riprendere il residuo della capsula due volte con 0,25 ml di etanolo a 50° per volta, travasando in una piccola provetta con tappo smerigliato (estratto *B*).

Riprendere il residuo dell'estratto in acetato di etile (contenente il ciclamato) con 0,5 ml di acqua travasando in un piccolo imbuto separatore. Lavare la capsula con 10 ml di etere etilico ed aggiungerli nell'imbuto separatore. Agitare energicamente per 2 min; lasciare separare le fasi e raccogliere lo strato inferiore in una piccola provetta contenente 0,5 ml di etanolo a 96°. Si ottiene in totale 1 ml di soluzione idroalcolica contenente eventualmente il ciclamato (estratto *A*).

5.4 *Identificazione della saccarina e del ciclamato.*

Si utilizza una metà della lastra di cellulosa per la ricerca della saccarina e l'altra metà per quella del ciclamato. Depositare alla distanza di 2 cm dal margine inferiore, sulla prima metà della lastra da 5 a 10 µl dell'estratto *A* e 5 µl della soluzione di ciclamato e sulla seconda metà da 5 a 10 µl dell'estratto *B* e 5 µl della soluzione di saccarina. Porre la lastra nella camera cromatografica, contenente il liquido di sviluppo (3.14). Lasciare migrare il liquido di sviluppo fino a 12 cm di altezza dalla linea di deposizione; estrarre la lastra e asciugare con aria calda; spruzzarla uniformemente con il reattivo alla benzidina (circa 18 ml per lastra); lasciarla asciugare all'aria e porla in stufa a 120-125°C per 3 min. Compaiono macchie grigio scuro su fondo marrone chiaro che imbrunisce col tempo.

5.5 *Identificazione del P-4000 e della dulcina.*

Deporre sulla lastra di poliammide 5 µl dell'estratto *B* e 5 µl delle soluzioni di dulcina e di P-4000. Porre la lastra nella camera cromatografica contenente il liquido di sviluppo 3.15. Lasciare migrare il solvente fino ad un'altezza di 12 cm. Estrarre la lastra, asciugarla con aria fredda e spruzzarla con 15 ml del rivelatore alla p-dimetilamminobenzaldeide. Asciugare con aria fredda fino alla comparsa delle macchie di colore giallo arancio.

7. Osservazioni

Il reattivo alla benzidina permette di rilevare 2 µg di saccarina e 5 µg di ciclamato; il reattivo alla paradimetilamminobenzaldeide 0,3 µg di dulcina e 0,5 µg di P-4000. Nelle condizioni sperimentali descritte è possibile rilevare edulcoranti sintetici, aggiunti al prodotto, nelle seguenti quantità:

saccarina	2-3 mg/l
ciclamato	40-50 mg/l
dulcina	1 mg/l
P-4000	1-1,5 mg/l

XLI - PRESSIONE AFROMETRICA

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione della pressione interna del vino in bottiglia con tappi di vario tipo.

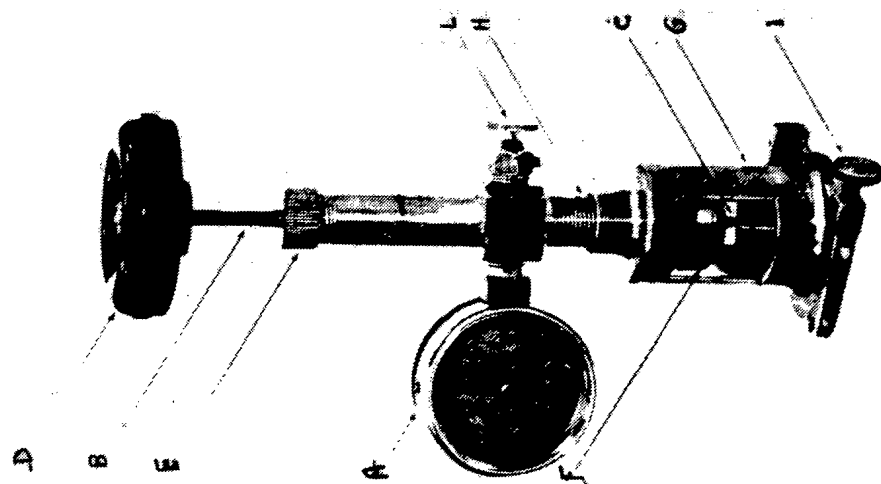
2. Principio del metodo

Determinazione afrometrica.

3. Apparecchiatura

3.1 *Afrometro De Rosa o equivalente.*

4. Procedimento

Stabilizzare la bottiglia in termostato alla temperatura di 20°C per una notte; applicare l'afrometro alla bottiglia manovrando con attenzione e cautela secondo le istruzioni (vedi figura). Leggere sulla scala il valore della pressione in atmosfere.

L'apparecchio è costituito da un manometro *A* montato su di un corpo centrale entro il quale scorre, in senso verticale, un'asta *B* portante ad un estremo la punta elicoidale C (ed all'altro la manopola di manovra *D* per la rotazione della punta stessa), asta guarnita da un premistoppa per la tenuta ermetica, regolabile quest'ultimo dal tappo filettato *E*. Il corpo centrale termina in basso con la testa a guarnizione elastica *F* la quale va strettamente contenuta contro il tappo della bottiglia da sottoporre a misurazione, a mezzo della rotazione della campanella *G* impegnata sulla filettatura dello stesso corpo centrale *H* (a fondo corsa per il tappo-corona o per il tappo di sughero previamente tagliato a raso collo, a inizio corsa invece per il tappo di plastica la cui testa ovviamente deve essere lasciata integra). La campanella stessa termina con un particolare morsetto, dotato di molle antagoniste di apertura e ampliamente regolabile nella sua chiusura a mezzo della vite 1. Con tale morsetto tutta la gamma dei diametri di collo delle bottiglie può trovare solido ancoraggio per le manovre di serraggio della testa a guarnizione contro il tappo. Completa l'apparecchio il piccolo sfiato a rubinetto *L* per un primo scarico della camera gassosa la cui pressione può inizialmente risultare alterata dalle manovre di introduzione della punta elicoidale (tale punta è qui di notevole diametro onde impedire che, nel caso di tappi di sughero, l'elasticità di compressione di quest'ultimo richiuda in maniera quasi ermetica il foro prodottovi da una punta sottile).

XLII - RADIOCARBONIO

Nei prodotti di origine biologica recente è presente radiocarbonio, mentre nei prodotti di sintesi ottenuti da petrolio o da carbone non lo si rinviene essendo "decaduto".

Il metodo di differenziazione fra i due prodotti ha perciò come fondamento la determinazione della concentrazione del radiocarbonio calcolata sul carbonio totale.

A ETANOLO DI SINTESI

1. Scopo e campo di applicazione

Differenziazione dell'etanolo di origine biologica da quello di sintesi (non biogenico) nel vino.

2. Principio del metodo

L'etanolo, estratto dal prodotto mediante distillazione, è sottoposto a conteggio per determinare il livello di radiocarbonio, mediante spettrometria a scintillazione nei liquidi.

3. Reattivi

3.1 *Etanolo a titolo non inferiore a 95° di sicura origine minerale.*

3.2 *Toluene marcato ^{14}C ad attività nota.*

3.3 *Liquido scintillatore del tipo miscibile con acqua, disponibile in commercio, oppure così composto:*

200 mg Dimetil-POPOP [1,4-bis-2-(4-Metil-5-Feniloxazolil)-Benzene] +4 g Butil PBD [2-(4-tert-Butilfenil)-5-(4-Bifenilil-1,3,4-Oxadiazolo] + 20 g Naftalene, sciolti con 100 ml di p-xylene (tipo per scintillazione).

4. Apparecchiatura

4.1 *Apparecchio distillatore a pressione atmosferica con colonna di rettifica in vetro (altezza 100 cm, Ø interno 20 mm) riempita interamente di anelli di Raschig in vetro (5x5).*

4.2 *Bilancia idrostatica per la determinazione del grado alcolico.*

4.3 *Contenitori da 25 ml di vetro, a basso tenore di potassio, per spettrometria a scintillazione nei liquidi.*

4.4 *Spettrometro a scintillazione nei liquidi con uno o più canali di conteggio, con elevata sensibilità per il ^{14}C e basso rumore di fondo.*

5. Procedimento

5.1 *Estrazione dell'etanolo da sottoporre a conteggio.*

Distillare 300÷700 ml di prodotto, a seconda del grado alcolico iniziale, utilizzando rapporti di riflusso di 30:70 in modo da raccogliere circa 70 ml della frazione che distilla a 78÷79°C. Sul distillato determinare il grado alcolico con bilancia idrostatica: tale valore deve essere compreso fra 94° e 96°.

5.2 *Misura radiochimica.*

A parità di tempo di conteggio l'errore statistico della misura è tanto minore quanto minore è il valore di

$$y = \frac{\sqrt{B}}{2{,}22 \cdot E \cdot M}$$

dove B è il valore della attività di fondo espresso in *cpm*; E è l'efficienza di conteggio data dal rapporto fra gli impulsi contati (*cpm*) e le disintegrazioni effettive (*dpm*) di un materiale radioattivo noto (pertanto *cpm/dpm* è sempre inferiore a 1); M rappresenta i grammi di carbonio sottoposti a conteggio.

Per l'applicazione del metodo occorre realizzare nelle condizioni operative un valore di $y \leq 1$.

Poiché alcuni dei parametri che determinano il valore della y sono influenzati dal tipo di liquido scintillatore utilizzato, dal tipo di spettrometro e da condizioni ambientali, è opportuno che ogni operatore ricerchi le proprie condizioni ottimali di misura.

5.2.1 *Ottimizzazione delle condizioni di misura.*

Viene eseguita una sola volta e permette di determinare il rapporto liquido scintillatore/etanolo al quale corrisponde il minor valore di y. Si opera su una serie di "campioni di fondo" costituiti da quantità variabili di etanolo sintetico a 95°, normalmente comprese fra 10 e 17 ml, addizionate di quantità di liquido scintillatore (da 13 a 6 ml) onde mantenere costante il volume totale (23 ml). Addizionare, ad una eguale serie di campioni, toluene ^{14}C ad attività nota (10.000÷30.000 dpm per campione), onde misurare l'efficienza di con-

teggio nelle medesime condizioni. Il conteggio dei "campioni di fondo" deve essere protratto per almeno 400 min, quello per la misura della efficienza per 5÷10 min.

Il rapporto liquido scintillatore/etanolo al quale corrisponde il minor valore di y è quello da utilizzare per il conteggio dell'etanolo distillato. È da tenere presente che, poiché l'etanolo è agente mediamente smorzante, è utile per ogni diverso rapporto liquido scintillatore/etanolo considerato, ricercare le condizioni strumentali alle quali è massima la figura di merito

$$F = \frac{E^2}{B}$$

5.2.2 *Conteggio dell'etanolo estratto e misura del rumore di fondo.*

Addizionare una quantità di etanolo distillato, pari a quella riconosciuta ottimale (5.2.1), con pipetta graduata e nell'apposito contenitore, alla corrispondente quantità di liquido scintillatore ("campione di misura"). Preparare analogo campione a partire dall'etanolo sintetico a 95° ("campione di fondo"). Sottoporre detti campioni a conteggio per almeno 400 min in unica o più misure, dopo averli mantenuti nello spettrometro prima della misura per alcune ore (periodo di stabilizzazione). Ripetere il conteggio del campione di fondo per ogni campione o serie di campioni da analizzare.

5.2.3 *Determinazione della efficienza di conteggio.*

L'efficienza della misura

$$\frac{cpm}{dpm}$$

può essere determinata o mediante standardizzazione interna o attraverso apposita curva di smorzamento (standardizzazione esterna).

Nel primo caso addizionare al campione di misura, al termine del conteggio o dei conteggi una quantità nota di toluene ^{14}C (pari a 10.000÷30.000 dpm) e sottoporre nuovamente a conteggio per 5÷10 min: il rapporto fra impulsi contati (cpm) e disintegrazioni del materiale radioattivo introdotto (dpm) dà il valore dell'efficienza di conteggio.

Nel secondo caso l'apparecchio deve disporre di almeno 3 canali ed essere provvisto di sorgente radioattiva standardizzata. Costruire preventivamente una curva di smorzamento (curva di taratura o curva di quenching) mediante conteggio di diversi campioni, con lo stesso rapporto (ottimale) liquido scintillatore/etanolo e lo stesso volume totale (23 ml), ma ottenuti con etanolo a diverso grado alcolico, e addizionati di una quantità nota di toluene ^{14}C (10.000÷30.000 dpm).

Ricavare un grafico dell'efficienza di ciascun campione in funzione del rapporto dei conteggi della sorgente standard, effettuati con i canali esterni a quello di misura del carbonio. Determinare l'efficienza di conteggio del campione incognito su detto grafico di taratura.

6. Espressione del risultato

Si esprime in *dpm/gC* (disintegrazioni per minuto per grammo di carbonio) calcolato con la formula:

$$\frac{Ncpm}{E \cdot C}$$

dove

Ncpm — numero degli impulsi misurati sul campione, diminuito di quelli del fondo

E — efficienza di conteggio

C — grammi di carbonio sottoposti a conteggio.

TABELLA I

Valori medi di radioattività da ^{14}C nell'etanolo di vini di sicura annata

Annata	dpm/g di C	Annata	dpm/g di C
1961	15,69	1971	19,56
1962	18,51	1972	18,81
1963	26,44	1973	18,53
1964	25,37	1974	18,49
1965	23,53	1975	18,28
1966	22,62	1976	17,94
1967	21,36	1977	17,67
1968	20,78	1978	17,45
1969	20,43	1979	17,14
1970	20,05	1980	16,81
		1981	16,59

Si considera dimostrata la presenza di etanolo di sintesi quando il valore di radioattività misurato risulta inferiore di oltre il 5% al valore medio di radioattività che compete all'annata di produzione o al periodo di possibile riferimento (v. tabella I).

Per un prodotto recente di cui non si conosca l'annata di produzione, il valore di radioattività misurato non deve essere inferiore di oltre il 5% al valore medio di radioattività riscontrato su campioni dell'ultima annata.

7. Osservazioni

Il metodo dà significative indicazioni anche sull'età dei vini ad annata dichiarata ed è applicabile a qualunque liquido comunque contenente etanolo.

L'esistenza nella apparecchiatura di più canali e di una sorgente radioattiva per la "standardizzazione esterna" è utile ma non indispensabile.

B ACIDO ACETICO DI SINTESI

1. Scopo e campo di applicazione

Differenziazione dell'acido acetico di origine biologica da quello di sintesi nell'aceto di fermentazione e nei liquidi di governo a base di aceto.

2. Principio del metodo

L'acido acetico, estratto dal prodotto mediante neutralizzazione con idrossido di calcio, distillazione parziale, spostamento dell'acido acetico nel residuo mediante acido solforico ed estrazione finale con etere, viene sottoposto a conteggio per determinare il livello di radiocarbonio mediante spettrometria a scintillazione nei liquidi.

3. Reattivi

3.1 *Calcio idrossido.*
3.2 *Calcio carbonato.*
3.3 *Acido solforico: soluzione 10 N.*
3.4 *Etere etilico.*
3.5 *Sodio cloruro.*
3.6 *Acido acetico, di sicura origine minerale.*
3.7 *Toluene marcato ^{14}C ad attività nota.*
3.8 *Liquido scintillatore del tipo miscibile con acqua, disponibile in commercio, oppure così composto:*

10 g PPO (2-5 difeniloxazolo) + 1 g POPOP [2(5-feniloxazolil) benzene] sciolti e portati a 1000 ml con toluene (tipo per scintillazione), e successivamente addizionati di 500 ml di metanolo.

4. Apparecchiatura

4.1 *Evaporatore rotante a pressione ridotta.*
4.2 *Contenitori da 25 ml di vetro, a basso tenore in potassio, per spettrometria a scintillazione nei liquidi.*
4.3 *Spettrometro a scintillazione nei liquidi con uno o più canali di conteggio, con elevata sensibilità per il ^{14}C e basso rumore di fondo.*

5. Procedimento

5.1 *Estrazione dell'acido da sottoporre a conteggio.*

Aggiungere a 500 ml di aceto (o quantità equivalente in acido acetico di liquido di governo) 16 g di idrossido di calcio, agitare energicamente, ed aggiungere 4 g di carbonato di calcio. In evaporatore rotante distillare a bagnomaria, a pressione ridotta (pompa ad acqua) ed alla temperatura di 55°C, 350-380 ml di liquido che vengono eliminati. Al residuo aggiungere 50 ml di acido solforico 10 N. Distillare ancora sotto vuoto fino a secchezza raccogliendo il distillato che viene saturato con cloruro di sodio e sottoposto ad estrazione per tre volte con 100 ml di etere etilico per volta, agitando energicamente per 3 min. Distillare le fasi eteree riunite eliminando, a pressione ridotta, le ultime tracce di solvente. L'acido acetico così ottenuto, che deve avere un titolo minimo del 70%, deve essere titolato (meglio se potenziometricamente) poco prima del prelievo.

5.2 *Misura radiochimica.*

A parità di tempo di conteggio l'errore statistico della misura è tanto minore quanto minore è il valore di

$$y = \frac{\sqrt{B}}{2{,}22 \cdot E \cdot M}$$

dove B è il valore dell'attività di fondo espresso in *cpm*; E è l'efficienza di conteggio data dal rapporto fra gli impulsi contati (*cpm*) e le disintegrazioni effettive (*dpm*) di un materiale radioattivo noto (pertanto *cpm/dpm* è sempre inferiore ad 1); M rappresenta i grammi di carbonio sottoposti a conteggio.

Per l'applicazione del metodo occorre realizzare nelle condizioni operative un valore di $y \leq 2$.

Poiché alcuni dei parametri che determinano il valore della y sono influenzati dal tipo di liquido scintillatore utilizzato, dal tipo di spettrometro e da condizioni ambientali, è opportuno che ogni operatore ricerchi le proprie condizioni ottimali di misura.

5.2.1 *Ottimizzazione delle condizioni di misura.*

Viene eseguita una sola volta e permette di determinare il rapporto liquido scintillatore/acido acetico al quale corrisponde il minor valore di y. Operare su una serie di "campioni di fondo" costituiti da quantità variabili di acido acetico sintetico, normalmente comprese fra 7 ml e 13 ml, con titolo prossimo a quello ottenibile per estrazione dall'aceto (5.1), addizionate di quantità variabili di liquido scintillatore (da 13 ml a 7 ml) onde mantenere costante il volume totale (20 ml). Addizionare ad una analoga serie di campioni toluene ^{14}C ad attività nota (10.000÷30.000 dpm per campione), onde misurare l'efficienza di conteggio nelle medesime condizioni. Il conteggio dei "campioni di fondo" deve essere protratto per almeno 400 min; quello per la misura della efficienza per 5÷10 min. Il rapporto liquido scintillatore/acido acetico al quale corrisponde il minor valore di y è quello da utilizzare per il conteggio dell'acido acetico estratto. È da tenere presente che, poiché l'acido acetico e l'acqua sono energici agenti smorzanti, è indispensabile per ogni diverso rapporto liquido scintillatore/acido acetico considerato ricercare le condizioni strumentali alle quali è massima la figura di merito

$$F = \frac{E^2}{B}$$

5.2.2 *Conteggio dell'acido acetico estratto e misura del rumore di fondo.*

Addizionare una quantità di acido acetico estratto pari a quella riconosciuta ottimale (5.2.1), con pipetta graduata e nell'apposito contenitore, alla corrispondente quantità di liquido scintillatore ("campione di misura").

Preparare analogo campione a partire da acido acetico sintetico, diluito con acqua distillata al titolo dell'acido acetico estratto ("campione di fondo").

Sottoporre detti campioni a conteggio per almeno 400 min in unica o più misure, dopo averli mantenuti nello spettrometro prima della misura per alcune ore (periodo di stabilizzazione). Ripetere il conteggio del campione di fondo per ogni campione o serie di campioni incogniti.

5.2.3 *Determinazione della efficienza di conteggio.*

L'efficienza della misura può essere determinata o mediante standardizzazione interna o attraverso apposita curva di smorzamento (standardizzazione esterna). Nel primo caso addizionare al campione di misura, al termine del conteggio o dei conteggi, una quantità nota di toluene ^{14}C (pari a 10.000÷30.000 dpm) e sottoporre nuovamente a conteggio per 5÷10 min: il rapporto fra impulsi contati (*cpm*) e disintegrazioni del materiale radioattivo introdotto (*dpm*) dà il valore dell'efficienza di conteggio. Nel secondo caso l'apparecchio deve disporre di almeno 3 canali ed essere provvisto di sorgente radioattiva standardizzata. Costruire preventivamente una curva di smorzamento (curva di taratura o curva di quenching) mediante conteggio di diversi campioni costituiti da quantità costante di liquido scintillatore (la quantità risultata ottimale al 5.2.1), da quantità variabili di acido acetico ed acqua per un volume totale costante (20 ml), e quantità nota di toluene marcato ^{14}C (10.000÷30.000 dpm).

Ricavare un grafico dell'efficienza di ciascun campione in funzione del rapporto dei conteggi della sorgente standard, effettuati con i canali esterni a quello di misura del carbonio. Determinare l'efficienza di conteggio del campione incognito su detto grafico di taratura.

6. Espressione del risultato

Si esprime in *dpm/gC* (disintegrazioni per minuto per grammo di carbonio) calcolato con la formula:

$$\frac{Ncpm}{E \cdot C}$$

dove

Ncpm — numero degli impulsi misurati sul campione, diminuito di quelli del fondo

E — efficienza di conteggio

C — grammi di carbonio sottoposti a conteggio.

Si considera dimostrata la presenza di acido acetico di sintesi quando il valore di radioattività misurato risulta inferiore di oltre il 5% al valore medio

di radioattività che compete all'ultima annata o al periodo di possibile riferimento.

7. Osservazioni

L'esistenza nella apparecchiatura di più canali e di una sorgente radioattiva per la "standardizzazione esterna" è utile ma non indispensabile.

C ANIDRIDE CARBONICA NON BIOGENICA

1. Scopo e campo di applicazione

Differenziazione della anidride carbonica di origine biogenica da quella di origine minerale nel vino spumante.

2. Principio del metodo

La anidride carbonica estratta dal prodotto, fissata con apposito apparecchio su idrato di litio o etanolammina, viene sottoposta a conteggio per determinare il livello di radiocarbonio mediante spettrometria a scintillazione nei liquidi.

I. METODO PER ASSORBIMENTO SU IDRATO DI LITIO

3. Reattivi

3.1 *Litio idrato; soluzione al 5% in acqua-etanolo (2+1).*
3.2 *Etanolo 95°.*
3.3 *Soluzione idroalcoolica: acqua-etanolo (2+1).*
3.4 *Metanolo.*
3.5 *Acido solforico concentrato (d — 1.84).*
3.6 *Calcio cloruro granulare per essiccatori.*
3.7 *Calcio cloruro anidro in polvere.*
3.8 *Litio carbonato di sicura origine minerale.*
3.9 *Toluene marcato ^{14}C ad attività nota.*
3.10 *Liquido scintillatore del commercio, oppure così composto:*

5 g PBD [2-fenil-5 (4-bifenil) 1,3,4-oxadiazolo] + 3 g BBOT [2,5-bis 2(5-tert-butilbenzoxazolil)-tiofene] sciolti in 1000 ml di p-xilene (tipo per scintillazione).

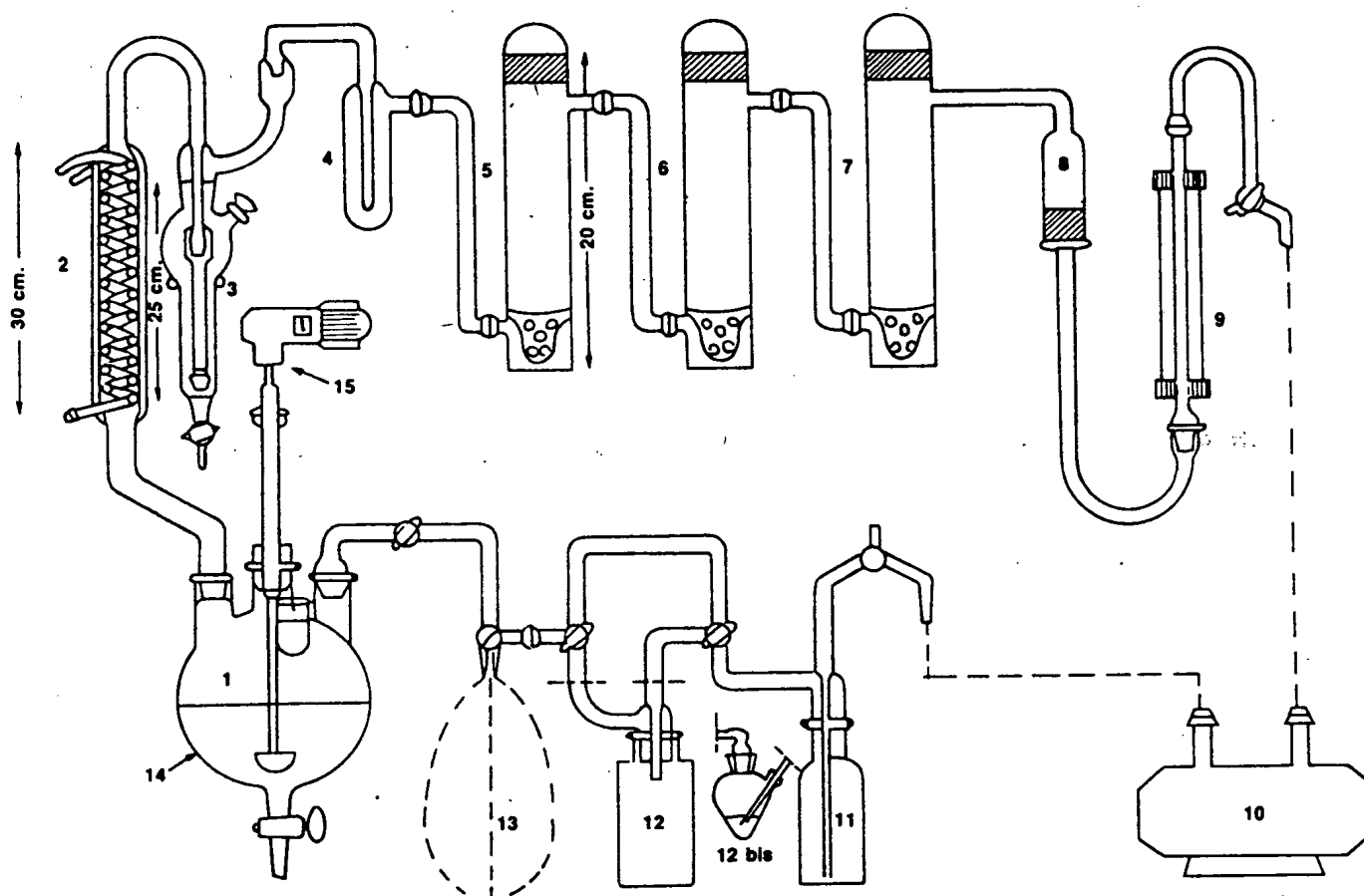
4. Apparecchiatura

4.1 *Apparecchio per l'estrazione e l'assorbimento della CO_2, come da schema riportato nella figura.*
4.2 *Contenitori da 25 ml di vetro, a basso tenore in potassio, per spettrometria a scintillazione nei liquidi.*
4.3 *Spettrometro a scintillazione nei liquidi con almeno 3 canali di conteggio (di cui 2 "esterni") e dotato di sorgente radioattiva per la "standardizzazione esterna"; tale apparecchio, con cella di conteggio termostatabile a 16÷18°C nel caso di liquido scintillatore al p-xilene, deve inoltre avere una elevata sensibilità per il ^{14}C e un basso rumore di fondo.*

5. Procedimento

5.1 *Estrazione della anidride carbonica e conversione in carbonato di litio.*

Porre 1500 ml di vino spumante refrigerato a 4°C nel pallone dell'apparecchio (1 nello schema); per una completa estrazione della anidride carbonica dal campione è opportuno mantenere il liquido a caldo e in agitazione utilizzando il mantello riscaldante (14) e il motore agitatore a bacchetta (15).

L'assorbimento della anidride carbonica avviene mediante gorgogliamento per riciclazione con pompa aspirante-premente in 600 ml della soluzione idroalcolica di idrato di litio contenuta nella bottiglia di reazione in polietilene (12).

SCHEMA APPARECCHIO PER L'ESTRAZIONE E L'ASSORBIMENTO
DELLA ANIDRIDE CARBONICA

1 Pallone da 3 l - 2 Refrigerante - 3 Trappola ad acido solforico - 4 Trappola di sicurezza - 5 Trappola a cloruro di calcio granulare - 6 Trappola a cloruro di calcio in polvere - 7 Trappola a gel di silice - 8 Filtro a lana di vetro e cotone - 9 Flussimetro - 10 Pompa aspirante premente a membrana - 11 Trappola di curezza - 12 Bottiglia di reazione in polietilene da 1 l - 13 Polmone - 14 Mantello riscaldante - 15 Motore con agitatore a bacchetta.
Il gas estratto per agitazione e riscaldamento del prodotto, posto nel pallone (1), viene riciclato mediante pompa aspirante-premente (10) nelle trappole 3-5-6, contenenti rispettivamente acido solforico, cloruro di calcio granulare e in polvere, e quindi nella bottiglia di reazione (12) contenente la soluzione di idrato di litio (12 bis contenente etanolammina).

Ad estrazione ultimata lasciare decantare per qualche minuto il liquido contenente il carbonato di litio precipitato, asportare la maggior parte del surnatante e centrifugare il rimanente (2000÷3000 giri per 10 min). Lavare il precipitato così ottenuto con 150 ml della soluzione idroalcolica e successivamente 3 volte con 100 ml di metanolo. Essiccare il precipitato finale sotto vuoto (pompa ad acqua) in essiccatore sino ad eliminare tutte le tracce di solvente.

5.2 *Misura radiochimica.*

A parità di tempo di conteggio l'errore statistico della misura è tanto minore quanto minore è il valore di

$$y = \frac{\sqrt{B}}{2{,}22 \cdot E \cdot M}$$

dove B è il valore della attività di fondo espresso in *cpm*; E è l'efficienza di conteggio data dal rapporto fra gli impulsi contati (*cpm*) e le disintegrazioni effettive (*dpm*) di un materiale radioattivo noto (pertanto *cpm/dpm* è sempre inferiore ad 1); M rappresenta i grammi di carbonio sottoposti a conteggio.

Per l'applicazione del metodo occorre realizzare nelle condizioni operative un valore $y < 3$.

Per tale motivo si sottopone a conteggio la massima quantità possibile di carbonato di litio (12 g pari a 1,9 g di carbonio) a cui viene aggiunta una quantità fissa di liquido scintillatore (17 ml): essendo quindi prefissato il rapporto carbonato di litio/liquido scintillatore, l'ottimizzazione della misura consiste nel ricercare le condizioni strumentali in cui si ha il massimo valore della figura di merito

$$F = \frac{E^2}{B}$$

5.2.1 *Determinazione del valore di fondo.*

Pesare 12 g di carbonato di litio in contenitore di vetro e quindi addizionare 17 ml di liquido scintillatore (3.9), con pipetta graduata: è importante versare lentamente il liquido scintillatore sul contenuto senza agitare onde permettere la completa fuoriuscita dell'aria. Si può utilizzare sia carbonato di litio puro del commercio che quello ottenuto facendo gorgogliare, nell'apparecchio di assorbimento, anidride carbonica di sicura origine minerale: in quest'ultimo caso si riproducono esattamente le condizioni di conteggio di un carbonato di litio estratto da vino spumante.

Sottoporre a conteggio il campione così preparato, previa stabilizzazione nell'apparecchio per almeno 6 h, per almeno 600 min in 3 misure successive.

5.2.2 *Determinazione dell'efficienza di conteggio.*

L'efficienza di conteggio può essere determinata solo mediante standardizzazione esterna attraverso apposita curva di smorzamento: non è infatti possibile addizionare il toluene marcato al campione *già* sottoposto a conteggio, in quanto non si ottiene una sua uniforme distribuzione nella miscela carbonato di litio e liquido scintillatore.

È pertanto indispensabile preparare una serie di campioni di carbonato di litio a diverso grado di smorzamento (per esempio miscelando carbonato di litio puro per analisi con carbonato di litio risultato particolarmente quenciato), addizionare ad essi *prima* una quantità nota di toluene marcato ^{14}C (10.000÷30.000 dpm) e *successivamente* il liquido scintillatore.

Costruire un grafico dell'efficienza di ciascun campione in funzione del rapporto dei conteggi della sorgente standard, effettuati con i canali esterni a quello di misura del carbonio. Ricavare l'efficienza di conteggio del campione incognito da detto grafico di taratura.

5.2.3 *Conteggio del carbonato di litio estratto.*

Procedere come indicato per la misura del fondo che deve essere sempre eseguita per ogni campione o serie di campioni. Qualora si disponga di una quantità di carbonato di litio inferiore di 12 g ridurre in proporzione il volume di liquido scintillatore e alternare la misura con quella di un campione di fondo *preparato con le stesse quantità di prodotti.*

Il tempo totale di conteggio minimo resta di 600 min e va proporzionalmente aumentato diminuendo la quantità di carbonato posta in conteggio.

6. Espressione del risultato

Si esprime in *dpm/g* di C calcolato con la formula:

$$\frac{Ncpm}{E \cdot C}$$

dove

Ncpm — numero degli impulsi misurati sul campione, diminuito di quelli del fondo

E — efficienza di conteggio

C — grammi di carbonio sottoposti a conteggio.

Poiché l'errore della misura è inferiore al 10% del valore di radioattività trovato, si considera dimostrata la presenza illegale di anidride carbonica di origine minerale in un vino spumante o frizzante dichiarato a fermentazione naturale, quando il valore della radioattività riscontrato è inferiore a (13 — 1,3) dpm/g di carbonio. Tale valore limite tiene conto oltre che di tutti gli errori della misura, delle oscillazioni della radioattività ambientale e delle pratiche enologiche consentite.

II. METODO PER ASSORBIMENTO SU ETANOLAMMINA

3'. Reattivi

3'.1 *Etanolammina.*

3'.2 *Metanolo.*

3'.3 *Liquido scintillatore* così composto:

15 g di PPO (2,5 difenilossazolo) + 1 g di Bis-MSB [p-bis-(o-metilstiril)-benzene] sciolti in 1000 ml di toluene.

3'.4 *Toluene marcato* ^{14}C ad attività nota.

4'. Apparecchiatura

4'.1 *Apparecchio per estrazione e assorbimento della* CO_2.

Lo stesso apparecchio di cui al punto 4.1 del metodo I., con la differenza che la bottiglia di reazione 12 è sostituita da un palloncino a cuore da 50 ml a due colli attraverso uno dei quali passa un tubicino di vetro affilato che porta il gas a gorgogliare nell'etanolammina (n. 12 bis dello schema).

4'.2 *Contenitori da 25 ml per spettrometria a scintillazione nei liquidi.*

4'.3 *Spettrometro a scintillazione nei liquidi con uno o più canali di conteggio, con elevata sensibilità per il* ^{14}C *e basso rumore di fondo.*

5'. Procedimento

5'.1 *Estrazione dell'anidride carbonica.*

Pesare esattamente 7-8 ml di etanolammina nel palloncino assorbitore previamente tarato e collegare il palloncino stesso all'apparecchio di estrazione.

Porre il contenuto di una bottiglia di vino spumante, refrigerata a 4°C, nel pallone dell'apparecchio (1 dello schema), azionare la pompa e procedere all'estrazione per almeno 2-3 ore e comunque fino a quando nell'assorbitore le bolle di gas si svolgono con difficoltà per l'aumento di viscosità del liquido.

Ultimato l'assorbimento staccare il palloncino e pesarlo per determinare la quantità di anidride carbonica assorbita. Il tenore in CO_2 assorbita deve essere compreso fra il 20 e il 23%.

5'.2 *Misura radiochimica.*

5'.2.1 *Ottimizzazione delle condizioni di misura.*

Essendo prefissato il rapporto carbonato di etanolammina/liquido scintillatore, l'ottimizzazione della misura consiste nel ricercare le condizioni strumentali in cui si ha il massimo valore della figura di merito

$$F = \frac{E^2}{B}$$

5'.2.2 *Conteggio dell'anidride carbonica estratta e misura del rumore di fondo.*

Pesare esattamente, nell'apposito contenitore, 6 g di carbonato di etanolammina, addizionare 10 ml di metanolo, omogeneizzare con leggera agitazione ed aggiungere 5 ml del liquido scintillatore. Preparare in modo analogo un "campione di fondo" partendo da carbonato di etanolammina preparato con CO_2 di origine minerale. Sottoporre detti campioni a conteggio per almeno 400 min in unica o più misure, dopo averli mantenuti nello spettrometro prima della misura per alcune ore. Ripetere il conteggio del campione di fondo per ogni campione o serie di campioni da analizzare.

5'.2.3 *Determinazione dell'efficenza di conteggio.*

L'efficenza della misura

$$\frac{cpm}{dpm}$$

può essere determinata o mediante standardizzazione interna o attraverso apposita curva di smorzamento (standardizzazione esterna).

Nel primo caso addizionare al campione di misura, al termine del conteggio, una quantità nota di toluene ^{14}C (pari a 10.000÷30.000 dpm) e sottoporre nuovamente a conteggio per 5-10 min: il rapporto fra impulsi contati (*cpm*) e disintegrazioni del materiale radioattivo (*dpm*) dà il valore dell'efficenza di conteggio.

Nel secondo caso l'apparecchio deve disporre di almeno 3 canali ed essere provvisto di sorgente radioattiva standardizzata. Costruire preventivamente una curva di smorzamento mediante conteggio di diversi campioni ottenuti

con carbonato di etanolammina a diverso titolo in CO_2 (fra 13 e 27%) e addizionati di una quantità nota di toluene ^{14}C (10.000÷30.000 dpm). Calcolare le efficenze di ciascun campione e riportarle in grafico in funzione dei rapporti di canali (rapporto dei conteggi della sorgente standard effettuati con i canali non impegnati nel conteggio del carbonio). L'efficenza di conteggio del campione incognito si ricava da detto grafico.

6'. Espressione del risultato

Si esprime in *dpm/g* di C calcolato con la formula:

$$\frac{Ncpm}{E \cdot C}$$

dove

Ncpm — numero degli impulsi misurati sul campione diminuito di quelli del fondo

E — efficenza di conteggio

C — grammi di carbonio sottoposti a conteggio.

Poiché l'errore della misura è inferiore al 10% del valore di radioattività trovato, si considera dimostrata la presenza illegale di anidride carbonica di origine minerale in un vino spumante o frizzante dichiarato a fermentazione naturale, quando il valore della radioattività riscontrato è inferiore a (13 — 1,3) dpm/g di carbonio. Tale valore limite tiene conto oltre che di tutti gli errori della misura, delle oscillazioni della radioattività ambientale e delle pratiche enologiche consentite.

XLIII - ANTIFERMENTATIVI

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerca nel mosto e nel vino di alcuni antifermentativi.

2. Principio del metodo

Gli antifermentativi vengono estratti con etere etilico e identificati mediante cromatografia su strato sottile con rivelatori specifici.

3. Reattivi

3.1 *Acido solforico (1+4).*

3.2 *Etere etilico.*

3.3 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*

3.4 *Etere di petrolio (30-50°C).*

3.5 *Sodio cloruro: soluzione al 10%.*

3.6 *Sodio solfato anidro.*

3.7 *Gel di silice G.*

3.8 *Terra di silice G.*

3.9 *Acido salicilico: soluzione all'1% in etanolo a 95°.*

3.10 *Liquido di sviluppo: esano - acido acetico glaciale (96+4 v/v).*

3.11 *Rivelatore generale A: soluzione allo 0,05% di Rodamina B in etanolo a 95°.*

3.12 *Rivelatore generale B: soluzione di acqua ossigenata al 3%.*

3.13 *Rivelatore specifico A: soluzione al 3% di cloruro ferrico in etanolo a 95°.*

3.14 *Rivelatore specifico B: soluzione satura di acido tiobarbiturico (preparata al momento dell'uso).*

3.15 *Rivelatore specifico C: soluzione al 3% di tricloruro di titanio in etanolo a 95°.*

3.16 *Rivelatore specifico D: a) soluzione di timolo al 20% in etanolo a 95°; b) soluzione di acido solforico 4 N.*

3.17 *Rivelatore specifico E: a) soluzione allo 0,05% di blu di bromofenolo contenente lo 0,2% di acido citrico; b) soluzione di nitrato d'argento al 5%.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Agitatore rotativo a capovolgimento.*
4.2 *Attrezzatura per la cromatografia su strato sottile.*
4.3 *Lampada U.V.*

5. Procedimento

5.1 *Estrazione degli antifermentativi.*

Porre 100-150 ml di prodotto in un imbuto separatore cilindrico da 250 ml; acidificare con 3-4 ml della soluzione di acido solforico ed estrarre per tre volte con 25 ml di etere etilico per volta in agitatore rotativo per 15 min alla velocità di 30 giri/min.

Travasare la fase eterea in altro imbuto separatore cilindrico da 100 ml; lavare per tre volte con 10 ml di acqua per volta; aggiungere alla fase eterea 10 ml della soluzione di idrossido di sodio ed agitare per qualche minuto. Separare la fase acquosa alcalina, acidificare nettamente con la soluzione di acido solforico, estrarre prima con 10 e poi con 5 ml di una miscela di etere etilico-etere di petrolio (1+1). Separare e raccogliere la fase eterea, lavarla per 3 volte con 10 ml per volta della soluzione di cloruro di sodio; disidratare lasciando per alcune ore su solfato di sodio anidro; porre la miscela eterea in un vetro da orologio e lasciare evaporare il solvente a temperatura ambiente, in un essiccatore a gel di silice operando un leggero vuoto.

5.2 *Preparazione delle lastre.*

Mescolare 35 g di una miscela in parti uguali di gel di silice G e terra di silice G con 64 ml di acqua; agitare accuratamente la sospensione per circa 1 min in mortaio di porcellana e stratificarla sulle lastre entro il minuto successivo, in spessore di 0,25 mm.

La quantità così preparata è sufficiente per 4-5 lastre 20x20 cm. Lasciare asciugare all'aria e porle per 1 h in stufa alla temperatura di 120°C; conservare in essiccatore a gel di silice sotto vuoto fino al momento dell'uso.

5.3 *Deposizione della soluzione.*

Riprendere il residuo dell'estrazione degli antifermentativi, direttamente sul vetro da orologio, con qualche goccia di etere etilico. Deporre 10, 20, 30, 40, 50 µl di questa soluzione sulla lastra, allo scopo di avere almeno in un punto una quantità di antifermentativi tale da permettere una loro separazione ottimale e quindi un loro sicuro riconoscimento. La distanza della linea di partenza dal margine inferiore della lastra è di 2,5 cm; quella fra i punti di deposizione di almeno 2 cm. Porre sulla lastra anche 5 µl della soluzione di acido salicilico che serve per calcolare i rispettivi Rs.

5.4 *Sviluppo delle lastre.*

Lasciare saturare la camera cromatografica dei vapori del liquido di sviluppo dopo avere applicato su tre pareti delle strisce di carta da filtro pescanti nel liquido. Raschiare lo strato dai margini laterali della lastra per la larghezza di 1 cm. Porre la lastra nella camera di sviluppo e lasciare migrare il liquido fino a 2 cm circa dal bordo superiore. Operare ad una temperatura ambiente circa di 20°C. Estrarre la lastra ed asciugarla con una corrente di aria calda.

5.5 *Rivelazione delle macchie.*

Spruzzare la lastra abbondantemente ed in modo uniforme con il rivelatore generale A ed asciugarla con una corrente di aria calda.

Esporre la lastra alla luce UV (230 o 366 nm); le macchie fluorescenti corrispondenti ai vari antifermentativi vengono visualizzate con tonalità variabili dal rosa pallido al viola su fondo rosa intenso.

Spruzzare successivamente la lastra con il rivelatore generale B. Si ha una notevole accentuazione della fluorescenza degli esteri dell'acido p-ossibenzoico, mentre spariscono completamente le macchie fluorescenti di colore azzurrino che possono comparire negli estratti dei prodotti genuini.

Gli Rs medi degli antifermentativi rivelabili nelle condizioni sperimentali descritte sono riportati in tabella 1 alla pagina seguente.

5.6 *Caratterizzazione specifica dei diversi antifermentativi.*

Una volta accertata la presenza di uno o più antifermentativi in un prodotto, per una definitiva conferma, si deve ripetere l'estrazione e la separazione cromatografica con le modalità descritte in precedenza usando però uno o più rivelatori specifici per i diversi composti (Tabella II), con le tecniche seguenti ed operando sulla lastra preventivamente asciugata.

5.6.1 *Rivelatore specifico A.*

Spruzzare uniformemente la lastra con il rivelatore A e asciugarla con aria calda.

Alcuni antifermentativi danno macchie di colore caratteristico. In particolare è possibile distinguere l'acido p-ossibenzoico (macchia giallo-arancio) dai suoi esteri (nessuna macchia) e l'acido salicilico (macchia rosso-porpora)

TABELLA I

Antifermentativi	Rs (*)
Idrazide Fenil-pirrolica	0,00
Acido p-Ossibenzoico	0,07
0-Ossichinolina	0,12
p-ossibenzoato di metile, etile, propile, butile, benzile	0,15
D_3 (diossidiclorodifenilsolfuro)	0,18
Acido deidroacetico	0,75
Piracid	0,75
Acido salicilico	1,00
Acido cinnamico	1,17
Acido p-clorobenzoico	1,33
Vitamina K_3	1,36
Acido sorbico	1,42
Acido benzoico	1,61

(*) $Rs = \frac{\text{Rf acido salicilico}}{\text{Rf antifermentativo}}$

dall'acido benzoico (nessuna macchia). Spruzzare successivamente con il rivelatore generale B, che accentua ancor più le suddette differenze cromatiche: il colore dell'acido p-ossibenzoico rimane invariato, mentre compare una macchia grigia per i suoi esteri; la colorazione dell'acido salicilico tende a diminuire d'intensità col tempo e quella dell'acido benzoico diviene rosso porpora.

Con il rivelatore specifico A i colori delle macchie corrispondenti all'acido deidroacetico, al piracid, all'acido cinnamico, all'acido sorbico e al D_3, sono rispettivamente giallo-arancio le prime due, gialle le due seguenti e grigia l'ultima, mentre non si rilevano l'acido p-clorobenzoico e la vitamina K_3. Il successivo trattamento con il rivelatore generale B elimina le macchie dell'acido deidroacetico, del piracid e dell'acido sorbico, mentre lascia inalterata quella dell'acido cinnamico e fa virare al rosa quella del D_3.

5.6.2 *Rivelatore specifico B.*

Spruzzare uniformemente la lastra con il rivelatore specifico B con il quale si rivelano i seguenti antifermentativi: o-ossi-chinolina (macchia verde), acido salicilico (macchia rossa), acido cinnamico (macchia gialla) e acido sorbico (macchia rosso brillante).

5.6.3 *Rivelatore specifico C.*

Spruzzare uniformemente la lastra con il rivelatore specifico C con il quale si rivelano i seguenti antifermentativi: o-ossi-chinolina (macchia gialla), acido deidroacetico (macchia violetta), piracid (macchia gialla) e acido p-clorobenzoico (macchia rosso porpora).

5.6.4 *Rivelatore specifico D.*

Spruzzare uniformemente la lastra con la soluzione a) del rivelatore specifico D ed asciugarla in stufa a 90°C per 10 min. Spruzzare nuovamente la lastra con la soluzione b) dello stesso rivelatore e porre in stufa a 120°C per 10 minuti.

Si rivelano i seguenti antifermentativi: esteri dell'acido benzoico (giallo pallido); acido cinnamico (giallo intenso); vitamina K_3 (marrone); acido sorbico (rosso porpora); D_3 (rosa).

5.6.5 *Rivelatore specifico E.*

Spruzzare uniformemente la lastra con la soluzione a) del rivelatore specifico E ed asciugare in stufa a 85°C per 15 min. Spruzzare nuovamente la lastra con la soluzione b) dello stesso rivelatore.

Si rivelano i seguenti antifermentativi: acido deidroacetico; acido salicilico; acido cinnamico; acido sorbico (macchie gialle); D_3 (macchia azzurra).

6. Osservazioni

6.1 Poiché l'acido p-ossibenzoico può essere naturalmente contenuto nei vini, nel caso di accertata presenza di questa sostanza occorrerà verificare che la sua quantità sia superiore a 15 mg/l per poterne attribuire la presenza ad una aggiunta fraudolenta. A questo scopo occorre sottoporre ad estrazione una soluzione idroalcolica a 10 gradi contenente 15 mg/l di acido p-ossibenzoico, operando analogamente a quanto si fa sul vino ed impiegandone la stessa quantità. L'estratto verrà deposto sulla lastra accanto a quello del vino e sarà accertata la presenza di ac. p-ossibenzoico aggiunto se la macchia corrispon-

TABELLA II

ANTIFERMENTATIVO	RIVELATORE: Luce U.V.		Luce U.V.					
	Soluz. di rodamina B	Successivo spruzzamento con H_2O_2	Soluzione di cloruro ferrico	Successivo spruzzamento con H_2O_2	Soluzione di acido tiobarbiturico	Soluzione di cloruro di titanio	Soluzione di timolo	Soluzione di blu di bromofenolo e nitrato d'argento
Idrazide Fenil-pirrolica	rosa intenso	rosa intenso	rosa intenso	bruno	–	cerchio viola	porpora	–
Acido p-ossibenzoico	blu viola	blu viola	giallo arancio	giallo arancio	–	–	–	giallo
O-ossichinolina	porpora	viola	verde	verde	verde	giallo	–	–
p-ossibenzoato di metile, etile, propile, butile, benzile	rosa pallido	rosa intenso	– –	grigio –	– –	– –	giallo pallido	– –
D_3	viola	viola	grigio	rosa	–	–	rosa	azzurro
Acido deidroacetico	rosa con cerchio viola	rosa con cerchio viola	giallo arancio	–	–	violetto	–	giallo
Piracid	rosa con cerchio viola	rosa con cerchio viola	giallo arancio	–	–	violetto	–	–
Acido salicilico	porpora	porpora	porpora	porpora	porpora	giallo	–	giallo
Acido cinnamico	viola intenso	viola intenso	giallo	giallo	giallo pallido	–	giallo intenso	giallo
Acido p-clorobenzoico	rosa	rosa	–	–	–	porpora	–	–
Vitamina K_3	blu viola	viola porpora	–	–	–	–	marrone	–
Acido sorbico	rosa intenso	rosso intenso	giallo	–	rosso brillante	–	porpora ch.	giallo
Acido benzoico	porpora	porpora	–	porpora	–	–	–	giallo

dente, ottenuta dall'estratto del vino, sarà nettamente più intensa (è consigliabile una valutazione densitometrica) di quella ottenuta dall'estratto della soluzione campione.

6.2 Poiché è stata segnalata su alcuni vini toscani la presenza di sostanze non identificate che possono interferire nella ricerca dell'acido salicilico, qualora risulti presente detto antifermentativo si dovrà procedere ad una conferma secondo la seguente metodica.

– Prima di procedere all'estrazione con etere, sottoporre 100 ml di vino a distillazione in corrente di vapore raccogliendo 100 ml di distillato. Le sostanze interferenti non passano nel distillato sul quale si procederà come in 5.1.

XLIV - ACIDO DEIDROACETICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'acido deidroacetico nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

L'acido deidroacetico estratto con etere etilico, viene dosato colorimetricamente dopo reazione con vanillina.

3. Reattivi

3.1 *Etere etilico.*

3.2 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*

3.3 *Potassio idrossido: soluzione al 60%.*

3.4 *Vanillina: soluzione al 5% in etanolo a 70°.*

3.5 *Etanolo a 70°.*

3.6 *Acido deidroacetico: soluzione all'1% in idrossido di sodio 1 N.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Estrattore continuo per liquidi.*

4.2 *Bagno termostatico a temperatura regolabile.*

4.3 *Spettrofotometro o fotocolorimetro.*

5. Procedimento

5.1 *Estrazione dell'acido deidroacetico.*

Sottoporre 100 ml di prodotto ad estrazione continua con etere etilico. Il tempo di estrazione sarà stabilito per ogni singolo apparecchio determinando il tempo richiesto per estrarre almeno il 95% di una quantità nota di acido deidroacetico aggiunto, tenendo conto poi per i calcoli della resa di estrazione. Effettuata l'estrazione allontanare completamente l'etere per distillazione e riprendere il residuo con 2 ml di acqua.

5.2 *Dosaggio dell'acido deidroacetico.*

Filtrare su crogiolo a setto poroso (G 4) e lavare il residuo con 5 ml di acqua fredda.

Solubilizzare il residuo con 5 ml della soluzione di idrossido di sodio raccogliendo in matraccio da 25 ml. Aggiungere 4 ml di soluzione di idrossido di potassio e 4 ml di reattivo alla vanillina. Porre in bagno termostatico alla temperatura di 85°C per 20 min.

Raffreddare per immersione in acqua e portare a volume con etanolo a 70°.

Leggere la DO alla lunghezza d'onda di 508 nm in confronto ad una prova in bianco effettuata con gli stessi reattivi su 5 ml di acqua. Riferirsi ad una curva di taratura per determinare la quantità di acido deidroacetico nella presa da saggio.

5.3 *Preparazione della curva di taratura.*

In 4 matracci da 50 ml porre 5 - 10 - 15 - 20 ml della soluzione di acido deidroacetico e portare a volume con la soluzione di idrossido di sodio. Tali soluzioni contengono rispettivamente 1-2-3-4 mg di acido deidroacetico per millilitro. Prelevare 5 ml di ciascuna soluzione, porli in altrettanti matracci da 25 ml e procedere come in 5.2. Con i valori delle DO costruire la curva di taratura.

6. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di acido deidroacetico per litro.

XLV - DERIVATI MONOALOGENATI DELL'ACIDO ACETICO

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerca dei monoalogenoderivati dell'acido acetico nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

I derivati monoalogenati dell'acido acetico vengono estratti con etere etilico dal prodotto acidificato e trasformati in tioindaco per combinazione con acido tiosalicilico, ciclizzazione ed ossidazione guidata. Il tioindaco, di colore rosso, viene estratto con cloroformio.

3. Reattivi

3.1 *Acido cloridrico (1+2).*
3.2 *Etere etilico.*
3.3 *Sodio solfato anidro.*
3.4 *Sodio idrossido: soluzione 0,5 N.*
3.5 *Acido tiosalicilico: soluzione al 3% in idrossido di sodio 1,5 N.*
3.6 *Potassio ferrocianuro: soluzione al 2%.*
3.7 *Cloroformio.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Agitatore meccanico.*

5. Procedimento

Porre 100 ml di prodotto in un imbuto separatore da 500 ml; aggiungere 2 ml dell'acido cloridrico e 100 ml di etere etilico. Agitare per qualche secondo a mano e poi per 1 h con agitatore meccanico.

Separare e raccogliere lo strato etereo ed agitarlo per alcuni secondi con 8-10 g di solfato di sodio anidro.

Travasare l'estratto in un imbuto separatore, aggiungere 10 ml della soluzione di idrossido di sodio; agitare per 1 min e lasciar separare gli strati. Prelevare 0,5 ml di estratto alcalino e controllare per titolazione che il titolo sia compreso tra 0,4 e 0,6 N portandolo entro questi limiti, se necessario, con soluzione di idrossido di sodio a titolo noto.

Trasferire l'estratto alcalino, all'indicata normalità, in un tubo da saggio contenente 1 ml della soluzione di acido tiosalicilico, agitare per 30 sec e travasare in capsula di porcellana. Porre la capsula su bagnomaria bollente proiettandovi in superficie un flusso di aria fredda. Mantenere la capsula su bagnomaria per 1 h, tempo che deve essere rispettato anche se si verificasse la completa evaporazione del liquido.

Se nel corso dell'evaporazione si dovesse formare una crosta sulla superficie del residuo, occorre frantumarla con una bacchetta di vetro per facilitare l'evaporazione.

Porre la capsula in stufa a 200 ± 2°C per 30 min esatti. Dopo raffreddamento riprendere il contenuto della capsula con 4 ml di acqua; travasare in piccolo imbuto separatore; solubilizzare le ultime parti del residuo con 3 ml della soluzione di ferrocianuro di potassio e trasferire nell'imbuto separatore. Agitare per 20 sec, aggiungere 5 ml di cloroformio, agitare per capovolgimento 3 o 4 volte e lasciare decantare.

Una colorazione del cloroformio da rosa a rosso indica presenza di derivati monoalogenati dell'acido acetico.

XLVI - ACIDI ALOGENOCARBOSSILICI

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerca e differenziazione degli acidi alogenocarbossilici nel vino.

2. Principio del metodo

Gli acidi alogenocarbossilici, separati per estrazione con etere etilico, vengono identificati cromatograficamente dopo trasformazione nei corrispondenti aminoacidi.

La natura dell'alogeno legato al carbonio viene accertata cromatograficamente dopo mineralizzazione.

3. Reattivi

3.1 *Acido solforico (d = 1,84).*
3.2 *Etere etilico..*
3.3 *Ammoniaca (d = 0,886).*
3.4 *Soluzione acetonica di acido cloridrico: ml 1 di acido cloridrico concentrato portati a ml 100 con acetone.*
3.5 *Gel di silice G (per cromatografia).*
3.6 *Liquido di sviluppo (A) con rivelatore interno: miscela di butanolo, acido acetico, acqua (4+1+1) contenente lo 0,03% di ninidrina.*
3.7 *Gel di silice G (con contenuto in Cl e Fe < 0,01%).*
3.8 *Magnesio ossido: soluzione satura a freddo e filtrata.*
3.9 *Sodio fluoruro: soluzione 1 N.*
3.10 *Sodio cloruro: soluzione 1 N.*
3.11 *Potassio bromuro: soluzione 1 N.*
3.12 *Potassio ioduro: soluzione 1 N.*
3.13 *Liquido di sviluppo (B): etanolo, cloroformio, ammoniaca (100/100/4).*

3.14 *Rivelatore:*

a) acetato di mercurio 0,1% in etanolo a 96°, aggiunto di alcune gocce di acido acetico glaciale;

b) Difenilcarbazide 0,05% in etanolo a 96°.

4. Apparecchiatura

4.1 *Estrattore continuo per solventi più leggeri dell'acqua (vedi figura).*
4.2 *Bagno termostatico a temperatura regolabile.*
4.3 *Centrifuga.*
4.4 *Attrezzatura per la cromatografia su strato sottile.*

5. Procedimento

5.1 *Identificazione degli acidi carbossilici.*

5.1.1 *Estrazione degli acidi alogenocarbossilici.*

A 100 ml di prodotto aggiungere 0,5 ml di acido solforico e sottoporre ad estrazione continua con 100 ml di etere etilico. Il pallone di raccolta viene tenuto in bagno termostatico a 45°C circa.

Dopo almeno 24 h interrompere l'estrazione e allontanare l'etere distillandone circa 1/3 e facendo evaporare il rimanente a temperatura ambiente.

Si ottiene un residuo acquoso del quale si deporrà subito una macchia sulla lastra cromatografica per controllare l'eventuale interferenza di macchie aminoacido-simili.

5.1.2 *Formazione degli aminoacidi.*

Al residuo acquoso predetto aggiungere un ugual volume di ammoniaca; agitare con cura e mantenere in recipiente chiuso a temperatura ambiente per almeno 24 h.

Porre un'aliquota della miscela ammoniacale in una provetta da centrifuga e portare a secco in stufa alla temperatura di 90°C. Riprendere il residuo secco, se colorato, con 8 ml della soluzione acetonica di acido cloridrico agitando accuratamente e, dopo aver lasciato a contatto la miscela per almeno 2 h centrifugare per 10 min alla velocità di 3000 giri/min.

Separare la soluzione limpida, lavare il residuo due volte con la soluzione acetonica centrifugando ogni volta. Riunire le soluzioni limpide ed evaporare a 37°C sotto getto di aria.

Solubilizzare il residuo con 0,25 ml di acqua.

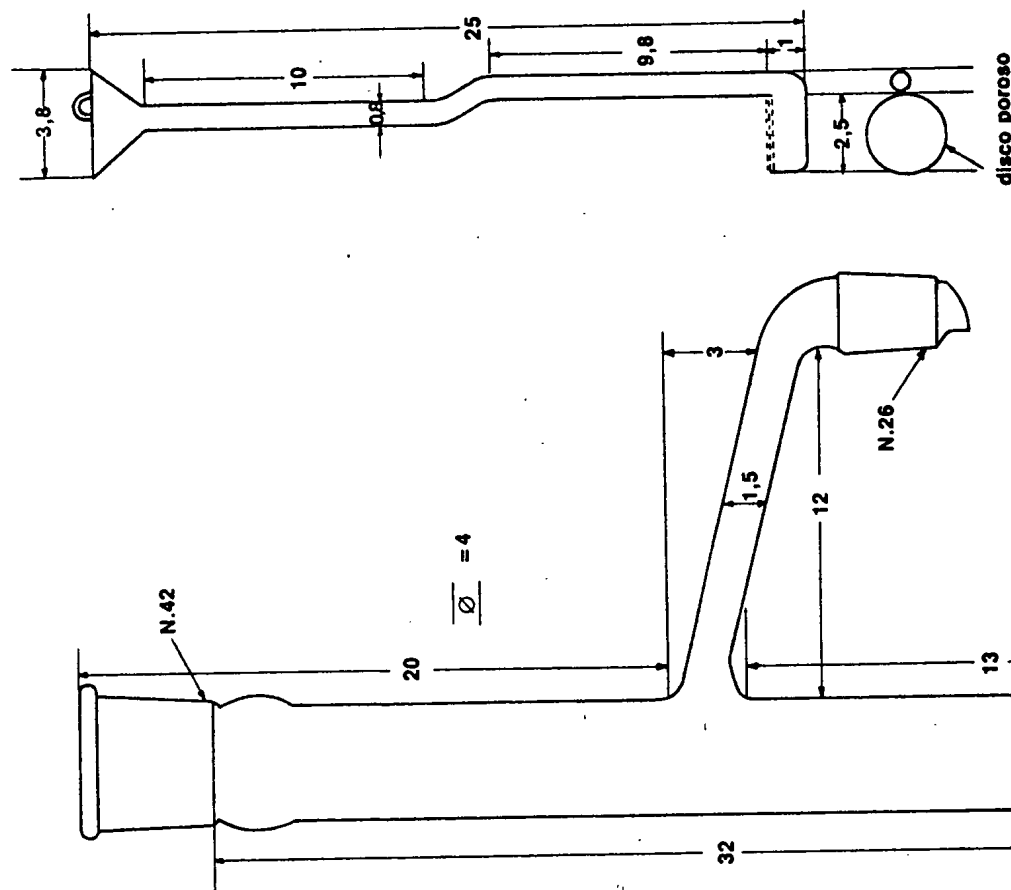
5.1.3 *Cromatografia.*

Deporre sulla lastra cromatografica: 5-10 µl della soluzione in esame, accanto alla macchia dell'estratto ottenuto dal vino prima del trattamento con ammoniaca e come test di riferimento per *Rf*, almeno due macchie di aminoacidi puri (ad es. glicina e α o β-alanina) e una macchia della sostanza in esame con aggiunta una quantità nota di un aminoacido.

Porre la lastra nella camera cromatografica già satura dei vapori del liquido di sviluppo (*A*) e lasciare migrare quest'ultimo per circa 18 cm. Estrarre la lastra e lasciarla asciugare a temperatura ambiente, quindi porla per 15 min in stufa a 95°C per ottenere lo sviluppo del colore.

Dal valore degli *Rf* e dal colore delle macchie si può risalire alla natura degli aminoacidi presenti e quindi a quella degli acidi alogenati originari.

5.2 ***Accertamento della natura dell'alogeno.***

Per accertare la natura dell'alogeno legato al carbonio si può eseguire la cromatografia dopo la relativa mineralizzazione (come in determinazione del cloro organico).

Estrattore continuo per solventi leggeri.

5.2.1 *Preparazione delle lastre cromatografiche.*

Sospendere 30 g di gel di silice (3.7) in 60 ml della soluzione di ossido di magnesio. Stratificare la sospensione in spessore di 0,4 mm. Far asciugare all'aria per 15 min e attivare poi in stufa per 90 min a 105°C.

Conservare le lastre così preparate, in essiccatore sotto vuoto.

5.2.2 *Cromatografia.*

Deporre sulla lastra la soluzione ottenuta dalla mineralizzazione dell'estratto etereo accanto alle macchie test dei vari alogenuri.

Sviluppare la lastra lasciando migrare il solvente (*B*) per 16-18 cm.

Lasciare asciugare la lastra a temperatura ambiente e porla poi in stufa a 90°C per 15 min. Spruzzare la lastra prima con la soluzione a) del rivelatore e, dopo averla lasciata asciugare, con la b).

Le macchie relative agli alogeni appaiono di colore diverso su fondo azzurro scuro (bianco — Cl e F; azzurro — Br e rosso — I) e con *Rf* nell'ordine successivo crescente; F, Cl, Br, I.

XLVII - CLORO ORGANICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del cloro organico nel mosto e nel vino e contemporanea ricerca del Bromo e dello Iodio.

2. Principio del metodo

Gli alogenoderivati organici vengono estratti con etere etilico. Dopo mineralizzazione ed eliminazione dello iodio eventualmente estratto, i cloruri vengono determinati complessometricamente insieme ai bromuri. Sulla stessa soluzione viene effettuata la determinazione del bromo allo scopo di apportare la dovuta correzione (*).

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*

3.2 *Acido solforico: soluzione 1 N.*

3.3 *Blu di bromofenolo: soluzione allo 0,05% in metanolo.*

3.4 *Sodio cloruro: soluzione 0,001 N.*

3.5 *Nitrato mercurico: soluzione 0,001 N in acido nitrico 0,008 N.*

3.6 *Difenilcarbazide: soluzione allo 0,5% in metanolo.*

3.7 *Etere etilico.*

3.8 *Magnesio ossido.*

3.9 *Sodio nitrito: soluzione 0,1 N.*

3.10 *Cloroformio.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Estrattore continuo per solventi più leggeri dell'acqua (vedi acidi alogenocarbossilici).*

4.2 *Bagno termostatico a temperatura regolabile.*

5. Procedimento

5.1 *Normalizzazione della soluzione di nitrato mercurico.*

(*) Si determina solo la quantità di bromuri che, nelle condizioni del metodo, vengono a trovarsi nella soluzione di cloruri da titolare.

Per la determinazione del bromo si rimanda al metodo relativo.

In 5 beute da 50 ml porre 5 ml della soluzione di idrossido di sodio, una goccia di blu di bromofenolo e neutralizzare a viraggio giallo dell'indicatore con la soluzione di acido solforico.

Ad una delle beute aggiungere 10 ml di acqua, alle altre quattro 10 ml della soluzione di cloruro sodico.

Aggiungere due gocce di soluzione difenilcarbazide in tutte le beute e procedere alla titolazione con la soluzione di nitrato mercurico usando una buretta graduata a 1/20 di ml.

Far gocciolare lentamente la soluzione mercurica agitando fortemente fino a netto viraggio violetto dell'indicatore.

La media dei millilitri consumati, corretta dei millilitri consumati nella prova sui 10 ml di acqua serve per il calcolo del fattore di normalità della soluzione.

5.2 *Prova in bianco.*

Per evitare errori dovuti alla presenza di alogeni nei reattivi impiegati è indispensabile eseguire, in parallelo alla determinazione sul campione, una prova in bianco applicando il metodo per intero su 200 ml di acqua.

5.3 *Estrazione degli alogenoderivati organici.*

Sottoporre ml 200 di prodotto ad estrazione continua impiegando 100 ml di etere etilico e ponendo nel pallone di raccolta 5 ml della soluzione di idrossido di sodio, tenendo il pallone medesimo in bagno termostatico alla temperatura di 45°C. Dopo 24 h interrompere l'estrazione ed allontanare l'etere per distillazione.

5.4 *Mineralizzazione.*

Trasferire quantitativamente il liquido alcalino in capsula di platino, tirare a secco su bagnomaria e incenerire in muffola a 450°C.

Sciogliere le ceneri ottenute con 2 ml di acqua e 2 ml della soluzione di acido solforico; filtrare raccogliendo il filtrato in bicchiere da 50 ml.

Lavare la capsula con piccole porzioni di acqua (2-3 ml) che si versano ogni volta sul filtro vuoto, fino a raccogliere complessivamente ~15 ml di soluzione.

Accertarsi dell'acidità della soluzione controllando alla tocca con indicatore blu di bromofenolo che deve virare al giallo (pH 3,6-4).

Far bollire leggermente per 5 min in modo da eliminare ioni CN^- e S^{--} eventualmente presenti.

5.5 *Ricerca ed eliminazione degli ioduri.*

Al prodotto della mineralizzazione aggiungere 2 ml della soluzione di nitrito di sodio e 10 ml di cloroformio; agitare energicamente per 2 minuti, separare la fase cloroformica e lavare ancora 2 volte con 5 ml di cloroformio per volta, agitando ogni volta 1 min. Se l'estratto cloroformico è colorato in rosa sono presenti ioduri.

5.6 *Dosaggio di cloruri e bromuri.*

Trasferire la fase acquosa in un bicchiere e concentrare a piccola fiamma fino al volume di circa 10 ml per eliminare l'eccesso di acido nitroso. Lasciare raffreddare, aggiungere due gocce di soluzione di difenilcarbazide Titolare con la soluzione di nitrato mercurico operando come descritto in 5.1.

5.7 *Dosaggio dei bromuri eventualmente presenti.*

Trasferire il liquido risultante dalla titolazione in una capsula di porcellana, aggiungere 1 ml della soluzione di idrossido di sodio, 100 mg di ossido di magnesio e portare a secco su bagno-maria bollente.

Incenerire quindi in muffola a temperatura non superiore a 450°C.

Sulle ceneri così ottenute determinare il bromo come indicato nel metodo specifico (dosaggio dei bromuri).

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di cloro organico per litro, calcolati nel modo seguente:

6.1 *In assenza di Bromo*

$$(A - B) \cdot F \cdot 0{,}1773$$

dove:

A — ml di nitrato mercurico impiegati nella prova sul campione
B — ml di nitrato mercurico impiegati nella prova in bianco
F — fattore di normalità della soluzione.

6.2 *In presenza di Bromo*

$$[(A - B) \cdot F - C] \cdot 0{,}1773$$

dove: C — microequivalenti di Bromo determinati come indicato sopra.

XLVIII - BROMO

A BROMO TOTALE

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del bromo totale nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

I bromuri presenti nel prodotto e quelli derivati dalla mineralizzazione dei composti bromurati organici vengono determinati colorimetricamente dopo trasformazione in tetrabromofenolsulfonftaleina.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione al 50% (p/p).*

3.2 *Latte di calce: soluzione 4 N contenente 120 g di CaO per litro.*

3.3 *Fenolsulfonftaleina: sciogliere 0,24 g di fenolsulfonftaleina (rosso fenolo) in 24 ml di soluzione di idrossido di sodio 0,1 N e portare al volume di 1 litro con acqua.*

3.4 *Soluzione tampone pH 4,65: a 500 ml di soluzione di acido acetico 2 N aggiungere 250 ml di soluzione di sodio idrossido 2 N e portare al volume di 1 litro con acqua.*

3.5 *Cloramina T: soluzione allo 0,2% preparata 48 ore prima dell'uso. La soluzione si conserva per 2 settimane a +4°C.*

3.6 *Sodio tiosolfato: soluzione al 2,5%.*

3.7 *Acido solforico: soluzione diluita (1+10).*

3.8 *Acido solforico: soluzione diluita (1+100).*

3.9 *Potassio bromuro: soluzione contenente 1,489 g di K Br per litro.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofotometro o fotocolorimetro.*

5. Procedimento

5.1 Porre in una capsula del diametro di 7 cm; 50 ml di prodotto, 0,5 ml della soluzione di idrossido di sodio e 1 ml della soluzione di latte di calce. Verificare che il pH sia ≥10. Coprire la capsula con un vetro da orologio e lasciare in riposo per 24 ore.

Evaporare quindi fino a secchezza su bagnomaria. Procedere all'incenerimento lasciando la capsula per 30 min in muffola a 525°C; dopo raffreddamento riprendere il residuo con 2-3 ml di acqua e tornare ad evaporare su bagnomaria. Calcinare ancora a 525°C e ripetere le suddette operazioni finché le ceneri ottenute siano di colore bianco-grigiastro.

Riprendere le ceneri con 5 ml di acqua bollente. Aggiungere mediante buretta acido solforico diluito (1+10) e poi (1+100) fino a portare il pH tra 4 e 5 controllando con una cartina-indicatore.

Sia x il volume delle soluzioni di acido solforico impiegate complessivamente. Aggiungere 10,2 — (x+5) ml di acqua. Disperdere con un piccolo agitatore il solfato di calcio precipitato. Travasare il contenuto della capsula in un tubo da centrifuga, centrifugare per 10 min e prelevare in un tubo da saggio gli 8 o 9 ml di liquido limpido.

5.2 *Saggio qualitativo.*

Questo saggio serve ad accertare se il contenuto in bromo del prodotto è compreso tra 0 e 1 mg/l; in tal caso il dosaggio può essere effettuato sulla soluzione delle ceneri senza preventive diluizioni.

In un tubo da saggio porre:
- 1 ml della soluzione delle ceneri;
- 1 goccia della soluzione tampone;
- 1 goccia della soluzione di fenolsulfonftaleina;
- 1 goccia della soluzione di cloramina T.

Dopo un minuto esatto arrestare la reazione per aggiunta di 1 goccia della soluzione di tiosolfato di sodio.

Se la colorazione ottenuta è gialla, giallo-bruna o giallo-verde, la soluzione delle ceneri può essere utilizzata tal quale.

Se la colorazione ottenuta è blu o violetta il prodotto contiene più di 1 mg/l di bromo. In tal caso occorre diluire la soluzione delle ceneri ripetendo il saggio qualitativo finché la colorazione ottenuta corrisponda ad un contenuto in bromo non superiore a 1 mg/l.

5.3 *Dosaggio.*

In un tubo da saggio porre:

- 5 ml della soluzione delle ceneri eventualmente diluita in base al saggio 5.2,
- 0,25 ml della soluzione tampone,
- 0,25 ml della soluzione di fenolsulfonftaleina,
- 0,25 ml della soluzione di cloramina T,

dopo 1 minuto esatto aggiungere:

- 0,25 ml della soluzione di tiosolfato sodico.

Leggere allo spettrofotometro l'assorbanza a 590 nm in vaschetta da 10 mm di percorso ottico usando un bianco ottenuto aggiungendo a 5 ml di acqua le stesse quantità di reattivi.

5.4 *Preparazione della curva di taratura.*

Al momento dell'uso preparare una soluzione contenente 10 mg/l di bromo a partire dalla soluzione di bromuro potassico 3.9.

In una serie di tubi da saggio introdurre 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 2,00; 2,50 ml della soluzione così preparata e completare a 5 ml con acqua. (Le quantità sopra indicate corrispondono a tenori di 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8 e 1,0 mg di bromo per litro di prodotto nelle condizioni operative descritte, senza diluizione della soluzione delle ceneri).

Trattare i 5 ml di ciascuna soluzione come indicato in 5,3.

Misurare le assorbanze di queste soluzioni in riferimento ad un bianco preparato trattando allo stesso modo 5 ml di acqua. Le assorbanze ottenute, riportate in funzione dei tenori in bromo corrispondenti, danno una retta leggermente incurvata verso l'origine.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di bromo totale per litro, calcolati dalla curva di taratura.

B BROMO ORGANICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del bromo organico nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

I composti bromurati organici vengono estratti con etere etilico. Dopo saponificazione e mineralizzazione si determinano i bromuri colorimetricamente.

3. Reattivi

Da 3.1 a 3.9 vedi bromo totale.

3.10 *Etere etilico.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Estrattore continuo per solventi più leggeri dell'acqua (v. det. del cloro organico).*

4.2 *Spettrofotometro o fotocolorimetro.*

5. Procedimento

5.1 *Estrazione.*

Porre 50 ml di prodotto addizionato di 0,5 ml di acido solforico nell'estrattore continuo nel cui pallone sono stati posti 100 ml di etere e 0,5 ml di soluzione di idrossido di sodio al 50%. Estrarre per 24 ore.

Separare l'etere per distillazione, travasare il residuo in una capsula del diametro di 7 cm insieme all'acqua di lavaggio del pallone; aggiungere 1 ml della soluzione di latte di calce.

Lasciare in riposo per 24 ore la capsula coperta da un vetro da orologio e continuare le operazioni come indicato per il bromo totale.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di bromo organico per litro.

IL - IODIO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dello iodio nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

Lo iodio, dopo mineralizzazione e ossidazione con acqua di bromo, viene determinato titolando con tiosolfato lo iodio che si libera dalla reazione tra iodati e ioduri.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione al 40%.*
3.2 *Sodio carbonato.*
3.3 *Acido fosforico: soluzione all'85%.*
3.4 *Acqua di bromo.*
3.5 *Acido salicilico.*
3.6 *Potassio ioduro.*
3.7 *Sodio tiosolfato: soluzione 0,005 N*
3.8 *Salda d'amido.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Microburetta graduata in centesimi di millilitro.*

5. Procedimento

Porre 100 ml del prodotto in esame in una capsula di porcellana; aggiungere 5 ml della soluzione di idrossido di sodio e 5 g di carbonato sodico.

Portare a secco su bagnomaria bollente; porre la capsula su un cartone di amianto e riscaldare a piccola fiamma fino a carbonizzazione; porre quindi la capsula in muffola a 500°C e tenervela per 15 min.

Dopo raffreddamento aggiungere 50 ml di acqua omogeneizzando il residuo carbonioso con una bacchetta di vetro e far bollire dolcemente per 10 minuti.

Filtrare attraverso filtro di carta e lavare ripetutamente capsula e filtro con acqua bollente raccogliendo complessivamente circa 300 ml di filtrato.

Neutralizzare al metilarancio con la soluzione di acido fosforico ed aggiungerne 1 ml in eccesso.

Aggiungere un eccesso di acqua di bromo (la soluzione deve risultare nettamente colorata in arancio-bruno) e far bollire la soluzione dolcemente fino a decolorazione prolungando poi l'ebollizione ancora per 5 min.

Aggiungere qualche cristallo di acido salicilico e raffreddare la soluzione a circa 20°C.

Aggiungere 1 ml della soluzione di acido fosforico e 0,5 g di ioduro di potassio; titolare lo iodio che si libera con soluzione 0,005 N di tiosolfato sodico servendosi della microburetta ed aggiungendo salda d'amido come indicatore quando il colore dovuto allo iodio liberatosi è quasi scomparso.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di iodio per litro, calcolati con la formula:

$$\frac{n \cdot N \cdot 1000}{6 \cdot V} \cdot 126{,}904$$

dove:

n — ml di soluzione di tiosolfato impiegati
N — normalità della soluzione di tiosolfato
V — volume di prodotto prelevato per l'analisi.

L - FLUORO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dei fluoruri nel mosto e nel vino.

A METODO VOLUMETRICO

2. Principio del metodo

Dopo incenerimento del campione i fluoruri vengono trasformati in acido fluosilicico per azione dell'acido solforico in presenza di silice e separati per distillazione in corrente di vapore surriscaldato che idrolizza l'acido fluosilicico in acido fluoridrico. I fluoruri vengono dosati nel distillato per titolazione con nitrato di torio in presenza di alizarin-sulfonato sodico come indicatore.

3. Reattivi

3.1 *Latte di calce al 10%.*
3.2 *Acido solforico (1+4 v/v).*
3.3 *Sodio idrossido: soluzione 0,1 N.*
3.4 *Alizarin Sulfonato sodico: soluzione allo 0,05%.*
3.5 *Acido acetico: soluzione al 10%.*
3.6 *Torio nitrato: soluzione 0,01 N.*
3.7 *Sodio fluoruro: soluzione 0,01 N.*

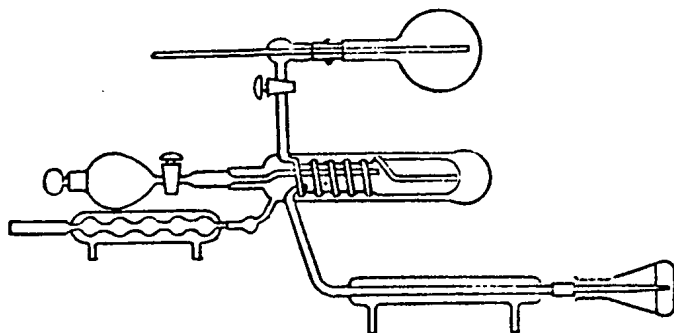
4. Apparecchiatura

4.1 *Apparecchio per distillazione in corrente di vapore illustrato in figura.*

5. Procedimento

5.1 *Estrazione dell'acido fluoridrico.*

A 100 ml di prodotto, posti in capsula di porcellana, aggiungere 3 ml di latte di calce, portare a secco su bagnomaria ed incenerire quindi in muffola a 525°C.

Trasferire le ceneri in un pallone da 250 ml adattabile all'apparecchio di

Apparecchio per distillazione in corrente di vapore

distillazione, servendosi di 50 ml della soluzione di acido solforico e procedere alla distillazione in corrente di vapore.

È necessario all'inizio far circolare una debole corrente di vapore e riscaldare il pallone per far salire rapidamente la temperatura a 140°C. La temperatura medesima va poi mantenuta a 145°C ± 5°C e in ogni caso non deve superare i 150°C per evitare il trascinamento di acido solforico.

Raccogliere 200 ml di distillato facendo pescare il tubo del refrigerante in 10 ml della soluzione di idrossido di sodio.

Per tenori in fluoro superiori a 10 mg/l è necessario prolungare la distillazione fino a raccogliere 500 ml.

5.2 *Dosaggio.*

Parallelamente alla titolazione sul campione fare una prova in bianco ponendo in una beuta, analoga a quella di raccolta, 10 ml di idrossido di sodio 0,1 N e 190 ml di acqua.

Aggiungere ad ogni beuta 0,3 ml della soluzione di alizoninsulfonato sodico e portare i due liquidi a pH 3 con la soluzione di acido acetico usando un pH-metro. Titolare il campione con soluzione 0,01 N di nitrato di torio fino a viraggio dal giallo al rosa.

Aggiungere alla prova in bianco la stessa quantità di soluzione di nitrato di torio impiegata, la soluzione si colora in rosa intenso. Riportare la colorazione alla stessa tinta rosa ottenuta nella titolazione del campione impiegando la soluzione di fluoruro sodico.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di fluoro per litro calcolati con la formula

$$n \cdot 1{,}9$$

dove:

n = ml di soluzione 0,01 N di fluoruro di sodio impiegati nella titolazione.

B METODO POTENZIOMETRICO CON ELETTRODO SPECIFICO

2. Principio del metodo

I fluoruri vengono determinati impiegando un elettrodo specifico a membrana solida. Il potenziale misurato è proporzionale al logaritmo dell'attività degli ioni fluoruro nel mezzo in esame.

3. Reattivi

3.1 *Soluzione Tampone pH 5,5.*

A 10 g di acido cicloesandiammino (1,2) tetracetico (CDTA) aggiungere una soluzione preparata con 58 g di sodio cloruro e 29,4 g di citrato trisodico, sciolti in 700 ml di acqua.

Disciogliere il CDTA aggiungendo soluzione di idrossido di sodio al 32% (circa 6 ml). Aggiungere infine 57 ml di acido acetico glaciale e portare a pH 5,5 con soda al 32% (circa 45 ml). Lasciare raffreddare e portare al volume di un litro con acqua.

3.2 *Sodio fluoruro: soluzione standard.*

2,210 g di fluoruro di sodio (corrispondenti a 1 g di F^-) seccati per 3-4 h a 105°C, vengono sciolti in acqua portando il volume ad un litro.

Questa soluzione serve per preparare le soluzioni standard di fluoruro secondo le indicazioni del metodo. Tutte le soluzioni di fluoruri devono essere conservate in bottiglie di plastica. Se sono necessarie soluzioni standard in cui il contenuto di fluoruri sia dell'ordine di ppm, queste dovranno essere preparate estemporaneamente.

4. Apparecchiatura

4.1 *pHmetro con graduazione in millivolt, dotato di un elettrodo specifico per ione fluoruro ed elettrodo di riferimento.*

4.2 *Agitatore magnetico munito di disco di amianto sulla piastra per proteggere la soluzione dal calore del motore.*

4.3 *Ancorette magnetiche ricoperte di plastica.*

4.4 *Bicchieri in plastica.*

5. Procedimento

Bisogna aver cura che tutte le soluzioni conservino durante la misura una temperatura di 25°C ± 1°C.

5.1 *Misura sul campione.*

In un bicchiere di plastica introdurre 10 ml di prodotto ed un ugual volume della soluzione tampone. Inmergere gli elettrodi e per tutta la

durata della misura agitare la soluzione in modo uguale e moderato. Quando lo strumento indicatore è stabile leggere il volare del potenziale in mV.

I volumi di campione e di tampone possono essere modificati in relazione alla forma e all'ingombro degli elettrodi utilizzati.

5.2 *Misura secondo il procedimento delle aggiunte note.*

Senza interrompere l'agitazione aggiungere alla soluzione del campione un volume noto di soluzione standard di fluoruro scegliendone la concentrazione in modo che:

a) venga raddoppiata o triplicata la concentrazione in fluoruri del prodotto analizzato,

b) il volume della soluzione rimanga praticamente costante (variazione ≤ 1%).

Leggere il nuovo valore del potenziale dopo l'aggiunta.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg/l di fluoruri calcolati con la formula:

$$\frac{V_a \cdot C_a}{V_o} \cdot \frac{1}{(antilog.\ \Delta E/S) - 1} \cdot d$$

dove:

C_a — concentrazione della soluzione aggiunta (mg/l)
V_a — volume di soluzione aggiunta (ml)
V_o — volume della soluzione prima dell'aggiunta (ml)
ΔE — differenza tra i potenziali misurati prima e dopo l'aggiunta (mV)
S — fattore di Nernst (59,16 mV a 25°C)
d — fattore di diluizione conseguente all'aggiunta del tampone.

Il calcolo è ulteriormente semplificato se i valori di V_a, C_a e V_o vengono scelti come esatte potenze di dieci.

LI - DIETILCARBONATO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del dietilcarbonato nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

Il carbonato dietilico, che prende origine dal pirocarbonato di etile aggiunto, viene estratto con solfuro di carbonio e determinato gascromatograficamente.

3. Reattivi

3.1 *Solfuro di carbonio: trattare 200 ml di solfuro di carbonio con 20 ml di acido nitrico fumante; lavare quindi con acqua, impiegandone 20 ml per volta, fino a neutralità delle acque di lavaggio.*
3.2 *Sodio solfato anidro.*
3.3 *Dietilcarbonato: soluzione standard in etanolo a 95° contenente 0,5 mg/ml.*
3.4 *Etanolo a 95°.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Centrifuga.*
4.2 *Gascromatografo con rivelatore a ionizzazione di fiamma.*
4.3 *Colonna cromatografica in acciaio inox della lunghezza di 2 m e del diametro interno di 3 mm, impaccata con polipropilenglicole al 15% su Celite 545, 60-100 mesh o colonna di analoghe prestazioni.*

5. Procedimento

5.1 *Estrazione del carbonato dietilico.*

Porre 100 ml di prodotto in un imbuto separatore da 250 ml. Aggiungere 1 ml di etanolo e 20 ml di solfuro di carbonio ed agitare per almeno 1 min.

Parallelamente, a 100 ml dello stesso prodotto, aggiungere 1 ml della soluzione standard di dietilcarbonato e 20 ml di solfuro di carbonio e agitare per 1 min.

Lasciare separare gli strati e trasferire parte delle fasi organiche in due tubi

da centrifuga e centrifugare per 2-3 min a 2000 giri/min. Seccare su solfato di sodio anidro.

5.2 *Gascromatografia.*

Iniettare successivamente 5 microlitri di ognuna delle soluzioni limpide nel cromatografo predisposto alle seguenti condizioni:

Temperatura della colonna 100°C
Temperatura dell'evaporatore 180°C
Temperatura del rivelatore 200°C
Gas di trasporto: azoto con un flusso di 25 ml/min.

6. Espressione del risultato

Si esprime in mg di dietilcarbonato per litro, calcolati con la formula:

$$\frac{(C \cdot AP \cdot 10)}{(AP' - AP)}$$

dove:

C — mg di dietilcarbonato/ml della soluzione standard
AP — area del picco del dietilcarbonato ottenuto operando sul prodotto tal quale
AP' — area del picco del dietilcarbonato ottenuto operando sul prodotto aggiunto della soluzione standard.

LII - ACIDO AZOTIDRICO

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerca dell'acido azotidrico nel mosto e nel vino.

2. Principio del metodo

L'acido azotidrico, separato per doppia distillazione, viene riconosciuto attraverso la reazione con ioni ferrici che dà una colorazione caratteristica.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione al 20%.*
3.2 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*
3.3 *Acido solforico: soluzione 1 N.*
3.4 *Acqua ossigenata: soluzione al 3%.*
3.5 *Ferro cloruro (ico): soluzione al 20%.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Piccolo distillatore a giunti smerigliati munito di pallone da 200 ml con refrigerante di Mohr da 40 cm con canna rastremata.*

5. Procedimento

In un pallone da 400 ml di un comune distillatore porre 200 ml di prodotto; neutralizzare con la soluzione di idrossido di sodio al 20% ed aggiungere 10 ml della soluzione di idrossido di sodio 1 N.

Distillare 130 ml di liquido evitando ogni caramellizzazione.

Trasferire il liquido residuo, dopo raffreddamento sotto acqua corrente, nel pallone da 200 ml dell'apparecchio di distillazione (4.1).

Aggiungere 20 ml della soluzione di acido solforico e 1 ml della soluzione di acqua ossigenata. Iniziare la distillazione facendo pescare l'estremità del refrigerante in un tubo da saggio graduato in ml contenente 1 ml di acqua distillata e immerso in acqua ghiacciata. Distillare lentamente sino a raccogliere 1 ml di distillato.

Aggiungere una goccia della soluzione di cloruro ferrico: in presenza di acido azotidrico si ottiene una colorazione dall'arancio al rosso, nettamente ri-

levabile rispetto ad una prova in bianco eseguita aggiungendo 1 goccia di soluzione di cloruro ferrico a 2 ml di acqua distillata.

Nei vini genuini la colorazione giallo citrina della soluzione di cloruro ferrico rimane invariata.

Come conferma eseguire lo spettro di assorbimento, tra 400 e 500 nm, della colorazione ottenuta.

La colorazione dovuta all'acido azotidrico è stabile e presenta il massimo di assorbimento a 460 nm; una colorazione simile, dovuta all'anidride solforosa, è labile, con massimo di assorbimento a 410 nm.

LIII - CLOROPICRINA

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione della cloropicrina nel mosto e nel vino.

A METODDO COLORIMETRICO

2. Principio del metodo

In presenza di ossigeno la cloropicrina reagisce con la dimetilanilina, formando una colorazione giallo-rossa dosabile colorimetricamente.

3. Reattivi

3.1 *Xilene (miscela degli isomeri orto, meta e para).*
3.2 *Sodio cloruro: soluzione satura.*
3.3 *Salda d'amido: soluzione all'1%.*
3.4 *Iodio: soluzione 0,1 N.*
3.5 *Sodio bicarbonato: soluzione al 2%.*
3.6 *Sodio solfato anidro.*
3.7 *Tricloronitrometano (cloropicrina).*
3.8 *N.N-dimetilanilina (poiché tende ad ingiallire col tempo, deve essere distillata di recente e conservata in frigorifero).*
3.9 *Benzoile perossido (con il 20-25% di acqua): soluzione xilenica. Sciogliere 1 g di perossido di benzoile in 10 ml di xilene e filtrare. La soluzione è stabile per 48 h.*
3.10 *Acido solfanilico: soluzione allo 0,8% in acido acetico al 30%.*
3.11 *N-1-naftiletilendiammina bicloridrato: soluzione allo 0,1%.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Apparecchio per distillazione in corrente di vapore a giunti smerigliati: pallone da 1 l con collo smerigliato e refrigerante di 100 cm di lunghezza.*
4.2 *Spettrofotometro.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

Introdurre 500 ml di vino (prelevati da recipiente *appena aperto*) nel pallone da distillazione con 5 ml di xilene. Chiudere col tappo smerigliato ed agitare energicamente per 1 min. Collegare il pallone all'apparecchio di distillazione; distillare in corrente di vapore, raccogliendo il distillato in un cilindro graduato da 100 ml, contenente 10 ml della soluzione satura di cloruro di sodio fino a completo passaggio dei 5 ml di xilene (normalmente è sufficiente raccogliere 50 ml di distillato). Trasferire in imbuto separatore, aggiungere 50 ml di acqua; agitare e lasciare in riposo per 1 h. Allontanare la fase acquosa e lavare la fase xilenica con 5 ml di acqua. Per accertare l'eventuale presenza di SO_2 aggiungere all'acqua di lavaggio due gocce di salda d'amido ed una goccia della soluzione di iodio.

In assenza di SO_2 (colorazione azzurra) procedere ad un secondo lavaggio con 5 ml di acqua. In presenza di SO_2 lavare con 5 ml della soluzione di bicarbonato di sodio e poi con 5 ml di acqua. Raccogliere la fase xilenica in provetta con tappo smerigliato; essiccare su solfato di sodio anidro (circa 1 g); agitare e lasciare in riposo per 12 h.

5.2 *Dosaggio della cloropicrina.*

A 2 ml della soluzione xilenica aggiungere 2 ml di dimetilanilina e 0,05 ml della soluzione di perossido di benzoile. Parallelamente eseguire una prova in bianco impiegando 2 ml di xilene preventivamente lavato con acqua ed essiccato con solfato di sodio anidro, 2 ml di dimetilanilina e 0,05 ml della soluzione di perossido di benzoile. Agitare e lasciare in riposo per 15 min. Misurare la DO a 350 nm del campione in confronto alla prova in bianco; eseguire la lettura entro 30 min. Detrarre dal valore della DO 0,05.

5.3 *Preparazione della curva di taratura.*

Pesare esattamente 100÷200 mg di cloropicrina in un matraccio da 50 ml con tappo smerigliato e portare a volume con xilene. Diluire la soluzione così ottenuta in modo da avere una soluzione di riferimento contenente esattamente 50 µg di cloropicrina per ml di soluzione xilenica.

In 5 tubi da saggio introdurre 0,4 - 0,8 - 1,2 - 1,6 - 2 ml della soluzione di riferimento, corrispondenti alle concentrazioni di 100, 200, 300, 400 e 500 µg/l di campione; aggiungere in ogni tubo la quantità di xilene necessaria per avere un volume totale di 2 ml. In un altro tubo da saggio introdurre 2 ml di xilene. Procedere come in 5.2. Costruire la curva di taratura con i valori delle DO.

6. Espressione del risultato

Si esprime in microgrammi di cloropicrina per litro.

7. Osservazioni

Nel caso si debba eseguire la determinazione su vini spumanti è conveniente eliminare l'anidride carbonica facendola gorgogliare attraverso un assorbitore nel quale si pongono 5 ml di xilene, perforando il tappo mediante un robusto ago cavo munito di rubinetto e collegato all'assorbitore. Cessato lo sviluppo di anidride carbonica, procedere come in 5.1, servendosi per l'estrazione dello xilene dell'assorbitore.

Il tubo da saggio, in cui si fa avvenire la reazione, deve essere perfettamente pulito ed asciutto, in modo che non rimangano goccioline di liquido lungo le pareti. Tali goccioline si colorano facilmente all'aria e possono modificare la lettura spettrofotometrica.

La presenza di cloropicrina viene confermata rivelando i nitriti che prendono origine dalla reazione fra cloropicrina e dimetilanilina, operando nel modo seguente: il liquido di reazione, dopo la lettura spettrofotometrica, viene dibattuto con 2 ml di acqua in un piccolo imbuto separatore; si separano le due fasi e ad 1 ml della fase acquosa si aggiungono 1 ml della soluzione di acido solfanilico e 1 ml della soluzione di N-1-naftiletilendiammina. In presenza di cloropicrina si sviluppa una colorazione dal rosa al rosso violetto.

B METODO GASCROMATOGRAFICO

2. Principio del metodo

La cloropicrina viene estratta con n-pentano sotto agitazione magnetica e identificata e dosata per gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni impiegando il tricloroetilene come standard interno.

3. Reattivi

3.1 *n-pentano (esente da impurezze che abbiano lo stesso tempo di ritenzione della cloropicrina e del tricloroetilene).*

3.2 *Cloropicrina (tricloronitrometano) distillata di fresco*
Attenzione: *la cloropicrina è molto volatile e tossica.*
La distillazione deve essere effettuata sotto vuoto, lentamente.
Per le eventuali perdite e per la bonifica della vetreria utilizzata bisogna disporre di una miscela di zolfo colloidale in acqua e sapone.

3.3 *Soluzione standard contenente 30 mg di tricloroetilene in 1 litro di etanolo assoluto (il tricloroetilene deve essere esente da impurezze che abbiano lo stesso tempo di ritenzione del n-pentano e della cloropicrina).*

3.4 *Acido acetico glaciale.*

3.5 *Alcol etilico assoluto.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Gascromatografo con rivelatore a cattura di elettroni.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.*

Prelevare il volume necessario del campione immediatamente dopo l'apertura; nel caso degli spumanti è necessario, con adatta apparecchiatura, far gorgogliare l'anidride carbonica nel n-pentano che sarà adoperato per l'estrazione. In questo caso il dosaggio della cloropicrina, eventualmente presente, è affetto da errore per eccesso a causa del trascinamento di parte della cloropicrina stessa presente nell'intera massa del campione.

Introdurre 10 ml del campione in pallone da 25 ml, addizionare 0,5 ml di una soluzione standard di tricloroetilene, 1 ml di n-pentano e l'ancoretta, chiudendo con il tappo. Sottoporre ad agitazione magnetica per 10', quindi far scendere lungo le pareti del pallone acqua distillata fino a che la fase pentanica raggiunga il collo; nel caso di emulsioni è sufficiente aggiungere una goccia di acido acetico glaciale.

5.2 *Analisi gascromatografica.*

L'estratto pentanico è iniettato nel gascromatografo nelle seguenti condizioni operative suggerite:

- colonna in vetro 1,8 m x 3 mm riempita con QF 1 al 2% e OV 17 all'1,5% su chromosorb W 80-100 mesh;
- rivelatore a cattura di elettroni;
- temperature: colonna 50°C, iniettore 150°C, rivelatore 150°C;
- gas di trasporto: argon/metano al 10% o azoto;
- volume da iniettare: 0,1 microlitri.

La identificazione della cloropicrina è ottenuta per confronto con il tempo di ritenzione di una soluzione standard in n-pentano.

5.3 *Preparazione della curva di taratura.*

Preparare una curva di taratura con soluzioni in n-pentano pari a 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mg/l di cloropicrina e 15 mg/l di tricloroetilene, ponendo in ascisse le corrispondenti concentrazioni nel vino (0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 mg/l) e in ordinate i rapporti tra le aree dei picchi della cloropicrina e del tricloroetilene. Nel campione in esame dal rapporto tra le aree si risale alla concentrazione dell'antifermentativo. Nel caso di campioni con tenori superiori di cloropicrina è sufficiente partire da volumi inferiori portati a 10 ml con alcol etilico al 10%, e procedere come descritto al punto 5.1.

6. Espressione del risultato

Si esprime in microgrammi di cloropicrina per litro.

7. Osservazioni

Nelle condizioni operative suggerite è possibile identificare e dosare quantità di cloropicrina pari a 10 microgrammi per litro.

LIV - METANOLO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del metanolo nei vini.

A) *METODO COLORIMETRICO*

2. Principio del metodo

Il metanolo viene ossidato con permanganato potassico a formaldeide che viene dosata colorimetricamente dopo reazione con il reattivo di Schiff.

3. Reattivi

3.1 *Reattivo di Schiff:* reattivo pronto del commercio.
3.2 *Permanganato potassico:* soluzione all'1%.
3.3 *Acido ossalico:* soluzione all'8%.
3.4 *Acido solforico 1:* 4 (v/v).
3.5 *Metanolo.*
3.6. *Etanolo assoluto* (esente da metanolo).
3.7 *Soluzioni tipo* preparate nel modo seguente:

Porre in un matraccio tarato da 500 ml una quantità di metanolo puro corrispondente a 5 ml di metanolo anidro e 50 ml di etanolo assoluto e portare a volume con acqua (Soluz. A). Un ml di questa soluzione contiene 0,01 ml di metanolo.

In un matraccio da 1000 ml porre 100 ml di etanolo assoluto e portare a volume con acqua (Sol. B). Introdurre in altrettanti matracci da 100 ml rispettivamente le seguenti quantità di soluzione A in ml: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e portare a volume con la soluzione B.

Preparare anche un tipo O costituito dalla soluzione B per la prova in bianco.

Ciascuna delle soluzioni tipo corrisponde ad un contenuto di alcol metilico pari a: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; ... 0,50 ml per 100 ml di alcol anidro.

4. Apparecchiatura

4.1 Spettrofotometro o fotocolorimetro.

5. Procedimento

Dopo aver determinato la gradazione alcolica, prelevare una quantità di vino corrispondente a 10 ml esatti di alcol anidro e distillare.

Portare il distillato ottenuto a 100 ml in modo da avere esattamente la gradazione di 10°.

In altrettanti tubi da saggio con tappo smerigliato porre rispettivamente in uno ml 1 del distillato in esame e negli altri 1 ml di ciascuna delle soluzioni tipo.

Porre in ogni tubo 5 ml della soluzione di permanganato, 1 ml di acido solforico e agitare. Dopo 2 minuti aggiungere 1 ml di acido ossalico ed agitare (si ha sviluppo di CO_2 e la soluzione assume colorazione giallastra).

Aggiungere ancora 1 ml di acido solforico e, quando il liquido è diventato perfettamente incolore, 5 ml del reattivo di Schiff e agitare ancora.

Dopo alcuni minuti si manifesta una colorazione violacea dovuta all'azione dell'aldeide acetica sul reattivo di Schiff ma dopo 4-5 ore questa colorazione scompare mentre permane stabile per lungo tempo la colorazione azzurrognola dovuta all'aldeide formata. Dopo 5-6 ore eseguire la lettura colorimetrica alla lunghezza d'onda di 570 nanometri contro la prova in bianco. Dalla curva di taratura ottenuta con le soluzioni tipo, si calcola la quantità di metanolo presente nel campione in esame espresso in ml % di alcol anidro.

6. Espressione del risultato

Si esprime in ml per cento ml di alcol complessivo con la formula

$$\frac{M \cdot S}{C}$$

dove:

M = ml di metanolo % ml di alcol anidro
S = titolo alcolometrico svolto
C = titolo alcolometrico complessivo

B) *METODO GASCROMATOGRAFICO*

2. Principio del metodo

Il metanolo viene determinato gascromatograficamente usando come standard interno il n-butanolo.

3. Reattivi

3.1 *Metanolo.*

3.2 *n-butanolo:* soluzione al 10% (v/v) in alcol a 50 gradi.

4. Apparecchiatura

Gascromatografo con rivelatore a ionizzazione di fiamma.

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione:*

Si utilizza il distillato preparato per la determinazione del titolo alcolometrico.

A 50 ml del distillato aggiungere 0,25 ml della soluzione di n-butanolo.

5.2 *Analisi gascromatografica:*

Il campione preparato come indicato in 5.1 viene iniettato nel gascromatografo predisposto alle seguenti condizioni: colonna in vetro, lungh. m 2, diametro interno mm 2, impaccata con Carbopack 80-100 mesh allo 0,2% di Carbowax 1500.

Temperatura evaporatore 150°C.

Temperatura rivelatore 150°C.

Temperatura colonna:

1 min. di isoterma a 50°C;

da 50°C a 130°C con incremento di 10°C/min;

isoterma finale: 10 min.;

quantità iniettata 1 microlitro.

5.3 *Calcolo del fattore di risposta:*

Su soluzioni a titolo noto di metanolo, procedere alla determinazione come indicato in 5.1 e calcolare il fattore di risposta del metanolo rispetto al n-butanolo con la formula

$$f = \frac{S \cdot C_M}{M \cdot C_S}$$

dove:

S = Area del picco dello standard interno

M = Area del picco del metanolo

C_S = Quantità di standard in ml/l

C_M = Quantità di metanolo in ml/l

6. Espressione del risultato

La quantità di metanolo, calcolata con il metodo dello standard interno, si esprime in ml per cento ml di alcol complessivo con la formula

$$\frac{M \cdot 10}{C}$$

dove:

M = quantità di metanolo in ml/1;

C = titolo alcolometrico complessivo.

ANALISI DEGLI AGRI DI VINO (ACETI)

I - ESAME ORGANOLETTICO

I caratteri organolettici da considerare nell'aceto sono: il colore, la limpidezza, l'odore e il sapore (vedi vini).

L'odore ed il sapore si apprezzeranno meglio, oltre che diluendo l'aceto con acqua tiepida, neutralizzando esattamente l'aceto con soda. Con questa ultima prova si avvertiranno le presenze di alcol, di aldeidi, e gli odori empireumatici.

Si dovrà infine osservare se l'aceto si intorbida per diluizione con acqua.

II - ACIDITÀ TOTALE

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'acidità totale negli aceti.

2. Principio del metodo

Neutralizzazione mediante idrossido di sodio di un determinato volume di aceto in presenza di fenolftaleina come indicatore.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione 0,1 N.*
3.2 *Fenolftaleina: soluzione alcolica all'1%.*

4. Procedimento

Diluire 10 ml di aceto a 100 ml. Prelevare 10 ml e titolare con la soluzione di sodio idrossido usando la fenolftaleina come indicatore.

5. Espressione del risultato

Si esprime in grammi di acido acetico per 100 ml di aceto, calcolati con la formula

$$n \cdot 0{,}006 \cdot 100$$

dove: n = ml di sodio idrossido 0,1 N impiegat

III - ACIDITÀ FISSA

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'acidità fissa nell'aceto.

2. Principio del metodo

Eliminazione degli acidi volatili per distillazione in corrente di vapore e titolazione dell'acidità del residuo in presenza di fenolftaleina.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione 0,1 N.*
3.2 *Fenolftaleina: soluzione alcolica all'1%.*

4. Procedimento

Distillare in corrente di vapore 25 ml di aceto fino a raccogliere almeno ml 600 di distillato.

Titolare il residuo della distillazione con la soluzione di sodio idrossido usando la fenolftaleina come indicatore.

5. Espressione del risultato

Si esprime in g di acido tartarico per 100 ml di aceto, calcolati con la formula:

$$n \cdot 0{,}0075 \cdot 4$$

dove: n = ml di sodio idrossido 0,1 N impiegati.

IV - ACIDITÀ VOLATILE

L'acidità volatile si calcola per differenza fra l'acidità totale e l'acidità fissa, espresse in g di acido acetico per 100 ml di aceto.

V - TITOLO ALCOLOMETRICO VOLUMICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del titolo alcolometrico volumico dell'aceto.

2. Principio del metodo

L'alcol, separato dall'aceto per distillazione, viene determinato densimetricamente.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione al 30%.*

3.2 *Acido solforico: soluzione diluita (1+4).*

4. Apparecchiatura

Picnometro o bilancia idrostatica.

5. Procedimento

Sottoporre a distillazione 100 ml di aceto dopo averli nettamente alcalinizzati con la soluzione di idrossido di sodio. Raccogliere circa 50 ml di distillato, aggiungere 50 ml di acqua e portare a reazione leggermente acida con la soluzione di acido solforico.

Sottoporre il distillato ad una seconda distillazione raccogliendo 50 ml di distillato in matraccio da 100 ml e portare a volume con acqua.

Determinare il contenuto in alcol per via densimetrica mediante picnometro o bilancia idrostatica (vedi vini).

6. Espressione del risultato

Si esprime in ml di alcol per 100 ml di aceto, calcolati dalle apposite tabelle (vedi vini).

VI - ESTRATTO SECCO TOTALE

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'estratto secco negli aceti.

2. Principio del metodo

Calcolo dell'estratto col metodo indiretto mediante determinazione della densità della soluzione dell'estratto, tenuto conto del contenuto in acido acetico.

3. Apparecchiatura

Picnometro o bilancia idrostatica.

4. Procedimento

Determinare:

p_1 = densità dell'aceto (vedi vini)

p_2 = densità del distillato ottenuto nella determinazione dell'alcol.

Calcolare la densità della soluzione dell'estratto con la formula:

$$p = (p_1 + 2) - (p_2 + p_3)$$

dove:

p = densità della soluzione dell'estratto

p_3 = densità di una soluzione acquosa, contenente una percentuale di acido acetico uguale a quella trovata nell'aceto in esame.

Il valore di p_3 si ricava dalla tabella I.

5. Espressione del risultato

Si esprime in g di estratto secco per litro, calcolati dalle apposite tabelle in base alla densità della soluzione dell'estratto (vedi vini).

TABELLA I

Acido acetico g in 100 ml	p_3 Peso specifico a $\frac{20°}{20°}$	Acido acetico g in 100 ml	p_3 Peso specifico a $\frac{20°}{20°}$
1,00	1,0014	4,60	1,0066
1,20	1,0017	4,80	1,0069
1,40	1,0020	5,00	1,0072
1,60	1,0023	5,20	1,0075
1,80	1,0026	5,40	1,0078
2,00	1,0029	5,60	1,0080
2,20	1,0032	5,80	1,0083
2,40	1,0035	6,00	1,0086
2,60	1,0037	6,20	1,0089
2,80	1,0040	6,40	1,0092
3,00	1,0043	6,60	1,0095
3,20	1,0046	6,80	1,0097
3,40	1,0049	7,00	1,0100
3,60	1,0052	7,20	1,0103
3,80	1,0055	7,40	1,0106
4,00	1,0058	7,60	1,0109
4,20	1,0061	7,80	1,0112
4,40	1,0064	8,00	1,0115

VII - ALDEIDE ACETICA

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'aldeide acetica nell'aceto.

2. Principio del metodo

L'aldeide acetica, separata per distillazione, viene fissata su metabisolfito e la combinazione aldeide-acido solforoso viene determinata iodometricamente.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*
3.2 *Fenolftaleina: soluzione all'1%.*
3.3 *Soluzione a pH 8,5-9:*
borato di sodio g 25
acido solforico 1 N ml 25
acqua fino ad un litro.
3.4 *Potassio metabisolfito: soluzione all'1,6%.*
3.5 *Soluzione tampone neutra:*
sodio fosfato bibasico (Na_2HPO_4 $12H_2O$) g 24
acido solforico 1 N ml 25
acqua fino ad un litro.
3.6 *Acido cloridrico: soluzione diluita 1+3 (v/v).*
3.7 *Soluzione alcalina:*
acido borico g 17,50
sodio idrossido 1 N ml 800
acqua fino a due litri.
3.8 *Salda d'amido: soluzione al 5‰.*
3.9 *Iodio: soluzione 0,1 N.*

4. Procedimento

Porre in un pallone di un apparecchio per la distillazione dell'alcol, da 25 a 100 ml di aceto, neutralizzare con soda 1 N, aggiungere un ugual volume della soluzione tampone a pH 8,5-9.

Distillare lentamente raccogliendo il distillato in una beuta contenente

50 ml di soluzione tampone neutra e 10 ml della soluzione di metabisolfito di potassio.

Usare un refrigerante a punta assottigliata, che si fa pescare direttamente nella soluzione e arrestare la distillazione quando il volume del liquido da distillare è ridotto alla metà.

Agitare la beuta e lasciare in contatto per 20 min; aggiungere 1 ml di salda d'amido, 100 ml di acqua, 10 ml della soluzione di acido cloridrico e quindi soluzione di iodio, per ossidare l'eccesso di bisolfito, fino al viraggio della salda d'amido.

Aggiungere 100 ml della soluzione alcalina e titolare subito con iodio fino a ricolorazione della salda d'amido. Siano n i ml impiegati in questa titolazione.

5. Espressione del risultato

Si esprime in mg di aldeide acetica per litro calcolati con la formula:

$$n \cdot 2,2 \cdot \frac{1000}{v}$$

dove:

n = ml di soluzione di iodio 0,1 N impiegati nella titolazione
v = ml di aceto impiegati nella determinazione.

6. Osservazioni

Per ottenere dati precisi è necessario che la titolazione segua immediatamente l'aggiunta della soluzione alcalina di borato; questa precauzione è importante nei dosaggi in serie per i quali vi è in genere la tendenza ad alcalinizzare tutti i liquidi contemporaneamente; l'attesa di 5 minuti provoca in effetti una perdita dell'ordine del 5% dovuta all'ossidazione rapida del solfito in mezzo alcalino.

VIII - ACETILMETILCARBINOLO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'acetilmetilcarbinolo nell'aceto.

2. Principio del metodo

L'acetilmetilcarbinolo è ossidato a caldo per mezzo di un miscuglio di cloruro ferrico e solfato ferroso. Il diacetile, separato dal liquido per distillazione, viene determinato come nicheldimetilgliossima.

3. Reattivi

3.1 *Cloruro ferrico: soluzione al 30%.*
3.2 *Solfato ferroso eptaidrato.*
3.3 *Ammonio idrossido (p.s. 0,880).*
3.4 *Reattivo di Van Niel:*

25 ml di acqua, 5 ml di soluzione di cloruro di nichel esaidrato al 10%, 2 ml di soluzione di cloidrato di idrossilammina al 20%, 5 ml di soluzione di cloridrato di idrossilammina al 20%, 5 ml di soluzione di cloruro di ammonio al 20% (quantità sufficiente per una determinazione).

4. Procedimento

Porre in un pallone da distillazione 25 ml di aceto, 5 g di solfato ferroso eptaidrato e 25 ml della soluzione di cloruro ferrico. Collegare il pallone ad una colonna di Vigreux (cm 30 a 6 punte) e procedere a lenta distillazione raccogliendo circa 30 ml di distillato nel reattivo di Van Niel, contenuto in una beuta da ml 100 raffreddata con ghiaccio. Aggiungere idrossido di ammonio fino a pH circa 7 (controllare con cartina all'indicatore universale) e lasciare in riposo per una notte la beuta tappata. Riscaldare la beuta chiusa su bagnomaria bollente per 90 min, raffreddare e tenere poi in ghiaccio per un'ora. Raccogliere il precipitato in un crogiolo filtrante (G 3) tarato, lavare con 100 ml di acqua ghiacciata, seccare a 110°C e pesare.

5. Espressione del risultato

Si esprime in mg di acetil-metil-carbinolo per litro calcolati con la formula:

$$p \cdot 0{,}64 \cdot \frac{1000}{v}$$

dove:

p — mg di nicheldimetilgliossima pesati
v — ml di aceto impiegati
0,64 — fattore di trasformazione da nicheldimetilgliossima ad acetilmetilcarbinolo, che tiene conto anche della resa del 96%.

IX - INDICE DI IODIO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'indice di iodio nell'aceto.

2. Principio del metodo

Si determina la quantità di iodio fissata da un determinato volume di aceto. Questa quantità, espressa in mg e riferita a 10 g di acido acetico (acidità totale) rappresenta l'indice di iodio caratteristico dell'aceto in esame.

3. Reattivi

3.1 *Iodio: soluzione 0,1 N.*
3.2 *Sodio idrossido: soluzione 2 N.*
3.3 *Acido cloridrico: soluzione 2 N.*
3.4 *Sodio tiosolfato: soluzione 0,1 N.*
3.5 *Salda d'amido.*

4. Procedimento

Porre in una capsula 50 ml di aceto ed evaporarli fino a piccolo volume su bagnomaria.

Riprendere il residuo con acqua e trasferirlo in matraccio da 50 ml portando a volume con le acque di lavaggio.

Porre 5 ml del liquido in una beuta, aggiungere 15 ml della soluzione di iodio e 10 ml della soluzione di idrossido di sodio. Tappare la beuta e porla in termostato a 40°C per 90 min.

Lasciar raffreddare, aggiungere 10 ml della soluzione di acido cloridrico e titolare l'eccesso di iodio con la soluzione di tiosolfato.

5. Espressione del risultato

Si esprime in mg di iodio riferiti a 10 g di acidità totale espressa in acido acetico.

ANALISI DEI SOTTOPRODOTTI DELLA VINIFICAZIONE

I - UMIDITÀ

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'umidità nelle vinacce e nelle fecce umide.

2. Principio del metodo

Il metodo consiste nel portare a peso costante mediante essiccazione in stufa a 70°C.

3. Apparecchiatura

3.1 *Stufa termostatica.*

4. Procedimento

Pesare 100 g di prodotto ben omogeneizzato e porre in capsula di vetro a fondo piatto. Essiccare in stufa a 70°C fino a peso costante. La percentuale di umidità è data dalla perdita di peso riscontrata.

5. Espressione del risultato

Si esprime in g % g di prodotto.

6. Osservazioni

Le vinacce e le fecce umide a causa dell'alto contenuto in acqua sono facilmente alterabili. La loro conservazione in barattoli di vetro o in buste di plastica ostacola ma non elimina del tutto i processi di alterazione. All'apertura del recipiente è necessario eliminare lo strato superiore, che spesso è visibilmente alterato, ed eseguire al più presto la determinazione.

II - TITOLO ALCOLOMETRICO

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione del titolo alcolometrico nelle vinacce e nelle fecce umide.

2. Principio del metodo

Il metodo consiste nell'estrarre l'alcol dalle vinacce e dalle fecce e, previa distillazione dell'estratto, nel determinare il titolo mediante densimetria o picnometria.

3. Reattivi

3.1 *Sodio idrossido: soluzione 1 N.*

4. Apparecchiatura

(Come in titolo alcolometrico CEE).

5. Procedimento

Pesare 100 g (fecce) o 200 g (vinacce), omogeneizzare e porre in pallone da distillazione a collo largo da 1 l. Aggiungere acqua distillata fino a coprire la parte solida, distillare e raccogliere il distillato (150 ml circa) in pallone da distillazione a collo normale. Neutralizzare il distillato con la soluzione di idrossido di sodio, ridistillare e raccogliere, in matraccio da 100 ml, 75 ml circa. Aggiungere 10-15 ml di acqua, termostatare a 20°C e portar a volume. Determinare il titolo alcolometrico secondo i metodi CEE.

6. Espressione del risultato

Si esprime in ml di alcol % g di prodotto.

III - ZUCCHERI RIDUTTORI

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione degli zuccheri riduttori nella vinaccia.

2. Principio del metodo

Gli zuccheri riduttori residui sono dosati, dopo estrazione, sfruttando la loro azione riducente sulla soluzione cupro-alcalina.

3. Reattivi

(Come in zuccheri riduttori CEE).

4. Apparecchiatura

(Come in zuccheri riduttori CEE).

5. Procedimento

Pesare 100 g di vinaccia e porre in pallone tarato da 1 l. Aggiungere acqua distillata e fare bollire per 1 h circa (compensare durante l'ebollizione l'acqua che evapora). Raffreddare il pallone in acqua corrente, portare a volume e filtrare. Sul filtrato, dopo le opportune diluizioni, determinare gli zuccheri secondo il metodo CEE.

6. Espressione del risultato

Si esprime in g % g di vinaccia.

7. Osservazioni

Detrarre dal risultato ottenuto 0,4 che tiene conto, approssimativamente, anche del volume occupato da 100 g di vinaccia.

IV - ACIDO TARTARICO NELLE VINACCE

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'acido tartarico totale nelle vinacce.

2. Principio del metodo

Il metodo consiste nel trasformare in bitartrato di potassio l'acido tartarico libero e salificato e nel titolare per alcalimetria.

3. Reattivi

3.1 *Acido cloridrico: soluzione d = 1,10.*
3.2 *Potassio carbonato: soluzione d = 1,49 (46% circa).*
3.3 *Acido acetico glaciale.*
3.4 *Potassio idrossido: soluzione 0,25 N.*
3.5 *Alcool etilico a 95° neutro.*
3.6 *Indicatore (cartine al tornasole).*

4. Apparecchiatura

4.1 *Bagno maria.*
4.2 *Pompa da vuoto.*

5. Procedimento

Introdurre 200 g di vinaccia ben tagliuzzata in matraccio da 1 l con 700 ml circa di acqua distillata e 18 ml della soluzione di acido cloridrico. Fare bollire per 1/2 h, raffreddare a temperatura ambiente, portare a volume e filtrare. Prelevare 250 ml del filtrato e introdurre in beuta da 500 ml. Aggiungere con cautela 5 ml della soluzione di carbonato di potassio e alcune gocce di antischiuma. Fare bollire a piccola fiamma e concentrare ad un volume tale da poterlo travasare, dopo raffreddamento, in matraccio da 200 ml.

Lavare bene la beuta raccogliendo le acque di lavaggio nello stesso matraccio, portare a volume, agitare e filtrare su filtro asciutto. Prelevare 100 ml del filtrato ed evaporare, in capsula di porcellana, a b.m. fino ad un volume di 15 ml circa. Aggiungere a goccia a goccia al liquido ancora caldo 3,5 ml dell'acido acetico ed agitare ininterrottamente per 5 min con bacchettina di vetro.

Dopo 10 min di riposo aggiungere 100 ml di alcol e agitare nuovamente

per 5 min; infine dopo ulteriori 10 min di riposo filtrare alla pompa su pasta di cellulosa, precedentemente spappolata in acqua e lavata sul filtro con alcol. Lavare accuratamente, sul filtro, il precipitato con alcol fino a scomparsa nel filtrato della reazione acida, avendo cura di rompere i cristallini formatisi che potrebbero includere dell'acido acetico.

Riportare con acqua calda e con l'aiuto della bacchettina di vetro, il filtro di cellulosa con il precipitato nella capsula. Aggiungere nella capsula acqua calda fino ad un volume di 200-250 ml, agitare dolcemente e fare bollire per 1 minuto.

Titolare il bitartrato a caldo con la soluzione di idrossido di potassio.

6. Espressione del risultato

I ml della soluzione di idrossido di potassio impiegati moltiplicati per il fattore 0,135 danno direttamente, già corretto, il titolo di acido tartarico.

Si esprime in g di acido tartarico totale % g di vinaccia.

7. Osservazioni

Il fattore 0,135 tiene conto della correzione da apportare a causa del volume occupato dai 200 g di vinaccia prelevata.

È necessario usare nella titolazione la soluzione di idrossido di potassio e non di sodio, perché il sale di Seignette ha reazione alcalina sulla cartina al tornasole.

V - ACIDO TARTARICO NELLE FECCE

1. Scopo e campo di applicazione

Determinazione dell'acido tartarico totale nelle fecce umide o essiccate.

2. Principio del metodo

Il metodo consiste nel trasformare in bitartrato di potassio l'acido tartarico libero e salificato e nel titolare per alcalimetria.

3. Reattivi

(Come in 3 - acido tartarico totale nelle vinacce).

4. Apparecchiatura

(Come in 4 - acido tartarico totale nelle vinacce).

5. Procedimento

Porre in mortaio di vetro (capacità 150-200 ml) 12 g di feccia essiccata e finemente macinata e 18 ml della soluzione di acido cloridrico. Mescolare accuratamente con il pestello e lasciare digerire per 10 min. circa. Trasferire quantitativamente la massa in un matraccio da 200 ml, portare a volume, agitare e filtrare su filtro a pieghe in recipiente perfettamente asciutto. Porre 100 ml del filtrato in beuta da 500 ml, fare bollire e aggiungere lentamente, lungo le pareti, 10 ml della soluzione di carbonato di potassio. Riscaldare prima lentamente ed infine fare bollire per 20 min. Travasare il residuo in matraccio da 200 ml, raffreddare a temperatura ambiente, portare a volume con acqua e filtrare su filtro a pieghe.

Porre 100 ml del filtrato in capsula di porcellana ed evaporare a b.m. fino ad un volume di 15 ml circa. Aggiungere goccia a goccia al liquido ancora caldo, lungo le pareti, 3,5 ml di acido acetico agitando ininterrottamente, con la bacchettina di vetro, per 5 min. Dopo riposo di 10 min aggiungere 100 ml di alcol e agitare ulteriormente per 5 min; infine dopo 10 min di riposo filtrare alla pompa su pasta di cellulosa, precedentemente spappolata in acqua e lavata sul filtro con alcol. Lavare accuratamente, sul filtro, il precipitato con alcol fino a scomparsa nel filtrato della reazione acida, avendo anche cura di rompere i cristallini formatisi che potrebbero includere dell'acido acetico.

Riportare con acqua calda e con l'aiuto della bacchettina di vetro, il filtro di cellulosa con il precipitato nella capsula. Aggiungere nella capsula ancora

acqua calda fino ad un volume di 200-250 ml, agitare dolcemente e fare bollire per 1 min. Titolare il bitartrato a caldo con la soluzione di idrossido di potassio.

6. Espressione del risultato

I ml della soluzione di idrossido di potassio impiegati moltiplicati per 1,25 danno il titolo di acido tartarico totale.

Si esprime in g di acido tartarico totale % g di feccia.

7. Osservazioni

Al risultato ottenuto è necessario effettuare le seguenti detrazioni che tengono conto del volume occupato dalle materie insolubili contenute nella quantità di sostanza primitiva pesata (12 g):

Titolo — 20% .... detrazione 0,80
Titolo — 30% .... detrazione 0,70
Titolo — 40% .... detrazione 0,60

È necessario usare nella titolazione la soluzione di idrossido di potassio e non di sodio, perché il sale di Seignette ha reazione alcalina sulla cartina al tornasole.

Il Ministro dell'Agricoltura e delle foreste
PANDOLFI

86A2615

GIUSEPPE MARZIALE, *direttore*

DINO EGIDIO MARTINA, *redattore*
FRANCESCO NOCITA, *vice redattore*

(7651711) Roma - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - S.

(c. m. 411200861610)

L. 4.200